

MOLEKULARBIOLOGISCHE UND
BIOINFORMATISCHE
ANALYSE
DES
PROTEINS KIAA0592/RISP
UND DES
DAZUGEHÖRIGEN GENS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Christian Bickel
München, 2003

Tag der mündlichen Prüfung 13. November 2003

Prüfungskommission:
1. Gutachter: PD Dr. Brack-Werner
2. Gutachter: PD Dr. Salmons

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Institut für Molekulare Virologie, Neuherberg

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS – HIV	1
1.2	KLASSIFIKATION UND MORPHOLOGIE DES HI-VIRUS.....	1
1.2.1	<i>Klassifikation.....</i>	1
1.2.2	<i>Morphologie und Genetik.....</i>	2
1.3	NUKLEO-ZYTOPLASMATISCHER TRANSPORT VON PROTEINEN UND RNA	3
1.4	HIV-1 REV – „REGULATOR OF EXPRESSION OF VIRION GENES“	6
1.5	.DIE INTERAKTION VON HIV-1 REV MIT ZELLULÄREN FAKTOREN ALS ANSATZ FÜR DIE ENTWICKLUNG VON HIV-INHIBITOREN	10
1.6	DAS „REV INTERACTING SHUTTLE PROTEIN“(RISP) UND DAS ZELLULÄRE KIAA0592-PROTEIN.....	13
1.7	VOM GENOM ZUM PROTEOM.....	15
1.8	ORGANISATION VON TRANSKRIPTIONELL REGULATORISCHEN BEREICHEN: PROMOTOREN.....	18
1.9	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
2	MATERIAL.....	21
2.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND WORTERKLÄRUNGEN	21
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	23
2.2.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	23
2.2.2	<i>Puffer und Lösungen</i>	25
2.2.2.1	<i>Pufferlösungen</i>	25
2.2.2.2	<i>Proteaseinhibitoren.....</i>	27
2.2.3	<i>Verwendete Kits.....</i>	28
2.2.4	<i>Bakterienmedien.....</i>	28
2.2.5	<i>Hefemedien.....</i>	28
2.2.5.1	<i>Aminosäurelösungen</i>	29
2.2.6	<i>Zellkulturmedien.....</i>	30
2.2.6.1	<i>Einfriermedium</i>	30
2.3	ANTIKÖRPER	30
2.3.1	<i>Antikörper gegen zelluläre Antigene.....</i>	30
2.3.2	<i>Antikörper gegen HIV-1 Proteine</i>	31
2.3.3	<i>Sonstige primäre Antikörper</i>	31
2.3.4	<i>Sekundäre Antikörper.....</i>	31
2.4	ALS PRIMER VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	31
2.5	PLASMIDE.....	33
2.5.1	<i>KIAA0592-Plasmide.....</i>	33
2.5.2	<i>Risp-Expressionsplasmide.....</i>	34
2.5.3	<i>Hefe 2-Hybridsystem</i>	35
2.5.4	<i>Säuger 2-Hybridsystem</i>	37
2.5.5	<i>Rev Expressionsplasmide</i>	39
2.5.6	<i>Vektoren zur Promotoranalyse.....</i>	41
2.5.7	<i>Kontroll-, Klonierungs- und Reportervektoren.....</i>	42
2.5.8	<i>Bakterielles artifizielles Chromosom (BAC).....</i>	43
2.6	ZELLINIEN	44
2.6.1	<i>Astrozytomzelllinien</i>	44
2.7	BAKTERIENSTÄMME.....	45
2.8	SPEZIALSOFTWARE.....	45

2.9	SPEZIALGERÄTE	46
3	METHODEN	47
3.1	ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN	47
3.1.1	<i>Kultivierung adhärenter Zellen und Zellzahlbestimmung</i>	47
3.1.2	<i>Auftauen und Einfrieren von Zellen</i>	47
3.1.3	<i>Transfektion eukaryotischer Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA</i>	48
3.1.3.1	Kalziumphosphat Kopräzipitationsmethode	48
3.1.3.2	Das FuGENE™6 Transfektionsreagenz	49
3.1.4	<i>Immunfluoreszenz an fixierten Zellen</i>	49
3.1.5	<i>Behandlung von Zellen mit Leptomycin B (LMB)</i>	50
3.1.6	<i>FACS-Analyse</i>	51
3.1.7	<i>Rev-Funktionsanalysen</i>	51
3.1.8	<i>Mikroinjektion von Peptiden in Zellen</i>	52
3.1.9	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	52
3.1.10	<i>Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle</i>	53
3.1.10.1	Quantifizierung der Lokalisation in der Zelle	53
3.1.10.2	Quantifizierungen der Transportaktivität von Peptiden	54
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	55
3.2.1	<i>DNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial</i>	55
3.2.2	<i>Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien</i>	56
3.2.3	<i>Plasmidgroßpräparation</i>	56
3.2.4	<i>Plasmidkleinpräparation</i>	57
3.2.5	<i>DNA-Restriktionsverdau</i>	57
3.2.6	<i>Agarosegelelektrophorese (AGE)</i>	58
3.2.7	<i>DNA-Isolierung aus Agarose Gelen</i>	58
3.2.8	<i>Ligationstechniken</i>	59
3.2.9	<i>Klonierungstechniken</i>	60
3.2.9.1	Transformation kompetenter E. coli mit Plasmid-DNA	60
3.2.9.2	Transformation von S. cerevisiae mit Plasmid-DNA nach der Lithium-Acetat Methode	60
3.2.9.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
3.2.9.4	Klonierung von PCR Fragmenten	62
3.2.9.5	Sequenzierung	64
3.3	PROTEINANALYTIK	64
3.3.1	<i>Proteinbestimmung mit Bicinchioninsäure (BCA)</i>	64
3.3.2	<i>Luciferase-Aktivitätsmessungen</i>	65
3.3.2.1	Promotoranalyse durch Luciferaseexpression.....	66
3.3.3	<i>Hefe 2-Hybridsystem für Proteininteraktionen</i>	66
3.3.4	<i>Checkmate™ Säuger 2-Hybridsystem für Proteininteraktionen</i>	67
3.3.5	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot</i>	69
3.3.5.1	Proteinisolation aus Zellkulturmaterial	69
3.3.5.2	Gelelektrophorese.....	69
3.3.5.3	Western Blot.....	70
3.3.6	<i>Markierung von Peptiden mit Fluoreszenzfarbstoffen</i>	71
3.4	RNA-UNTERSUCHUNGEN	71
3.4.1	<i>RNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial</i>	71
3.4.1.1	RNAzol-Methode	71
3.4.1.2	RNA-Isolierung mit RNEasy Kit (Qiagen).....	72

3.4.2	<i>Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)</i>	72
3.4.3	<i>Northern Blot</i>	73
3.4.4	<i>Herstellung radioaktiver Sonden</i>	74
3.4.5	<i>Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden</i>	75
3.4.6	<i>Detektion der markierten Banden</i>	75
3.4.7	<i>Entfernen („Strippen“) der hybridisierten Proben</i>	75
3.5	ONLINE DATENBANKEN UND IN SILICO SEQUENZANALYSEN.....	76
3.6	STATISTIK	77
4	ERGEBNISSE	79
4.1	„IN SILICO“ ANALYSEN DER KIAA0592-PROTEINSEQUENZ.....	79
4.1.1	<i>Vervollständigung der Aminosäuresequenz von KIAA0592</i>	79
4.1.2	<i>Homologe Proteine von KIAA0592</i>	82
4.1.2.1	<i>Annotierte humane Proteinsequenzen</i>	82
4.1.2.2	<i>Homologe Proteinsequenzen in anderen Säugetieren</i>	84
4.1.2.3	<i>Vergleichbarer Proteinaufbau in verschiedenen Säugerspezies</i>	85
4.1.3	<i>Sequenzeigenschaften des KIAA0592-Proteins</i>	87
4.1.3.1	<i>Struktureigenschaften des KIAA0592-Proteins: SOPM und COILS</i>	87
4.1.3.2	<i>Vorhersage möglicher Transmembranhelices: TMpred</i>	89
4.1.3.3	<i>Signalsequenzen für posttranslationale Modifikationen: PROSITE</i>	90
4.2	GENOMISCHE ORGANISATION DES KIAA0592-GENS	91
4.2.1	<i>Lokalisation und Anordnung des KIAA0592-Gens im menschlichen Genom</i> ..	91
4.2.2	<i>Die Genomsequenzen der zu KIAA0592 homologen Gene in der Maus und in der Ratte</i>	96
4.2.2.1	<i>Kartierung auf das Chromosom 6 der Maus</i>	96
4.2.2.2	<i>Kartierung auf das Chromosom 4 der Ratte</i>	98
4.3	DETEKTION DES TRANSKRIPTES VON KIAA0592.....	99
4.3.1	<i>RT-PCR – indirekte Detektion der KIAA0592-mRNA über ein cDNA-Intermediat</i>	99
4.3.2	<i>Northern Blot - direkte Detektion der KIAA0592-mRNA</i>	101
4.4	DETEKTION DES EXPRIMIERTEN KIAA0592-PROTEINS.....	103
4.4.1	<i>Herstellung von KIAA0592komplett-exprimierenden Plasmidvektoren</i>	103
4.4.2	<i>Detektion des KIAA0592-Proteins im Western Blot</i>	105
4.4.3	<i>Detektion und Lokalisation des KIAA0592-Proteins in verschiedenen Zelllinien</i>	108
4.5	IDENTIFIZIERUNG VON REGULATORISCHEN SEQUENZEN DES KIAA0592-GENS.....	111
4.5.1	<i>In silico Analyse der genomischen Regionen angrenzend an das KIAA0592-Gen auf transkriptionell regulatorische Elemente</i>	111
4.5.2	<i>In vivo Charakterisierung der Promotoreigenschaften der potenziell regulatorischen Sequenzen von KIAA0592</i>	115
4.6	CHARAKTERISIERUNG DER REV-BINDUNG VON RISP IM HEFESYSTEM.....	121
4.6.1	<i>Interaktionen im Hefe 2-Hybridsystem</i>	122
4.7	CHARAKTERISIERUNG DER REV-BINDENDEN EIGENSCHAFTEN VON RISP IN SÄUGERZELLEN	123
4.7.1	<i>Expression der Rev- und Risp-Fusionsproteine zum Einsatz im Säuger 2-Hybridsystem</i>	123
4.7.1.1	<i>Nachweis der Proteine im Zelllysate</i>	124
4.7.1.2	<i>Nachweis und Detektion der Risp- und Rev-Fusionsproteine in Zellen durch indirekte Immunfärbung und Fluoreszenz</i>	126

4.7.2	<i>Funktionsanalysen der Rev-Fusionsproteine des Säuger 2-Hybridsystems ..</i>	131
4.7.3	<i>Interaktion von Rev und Risp im Säuger 2-Hybridsystem.....</i>	132
4.8	IDENTIFIZIERUNG DER DIMERISIERUNGSEIGENSCHAFTEN VON RISP IM SÄUGER 2-HYBRIDSYSTEM.....	135
4.9	CHARAKTERISIERUNG DER CRM1-BINDUNG VON RISP IM SÄUGER 2-HYBRIDSYSTEM	136
4.10	LOKALISATIONSEIGENSCHAFTEN VON RISP.....	138
4.10.1	<i>Lokalisationen der Risp-Fusionskonstrukte mit einem GFP unter Einfluss von Leptomycin B</i>	138
4.10.2	<i>Wiedererlangung der Kernexportfähigkeit von Rev1-54 durch Risp.....</i>	141
4.10.3	<i>Analyse der Rev-Funktion der Fusionsproteine.....</i>	144
4.10.4	<i>Untersuchungen der Export- und Importfähigkeiten der Rev-NES und eines leucinreichen Risp-Peptids</i>	146
5	DISKUSSION	149
5.1	REV-INTERAGIERENDE FAKTOREN ALS ANSATZPUNKTE FÜR ANTI-HIV-THERAPEUTIKA	149
5.2	IDENTIFIKATION DER VOLLSTÄNDIGEN PROTEINSEQUENZ VON KIAA0592: EIGENSCHAFTEN, FUNKTIONALITÄT UND VERWANDTSCHAFTEN	151
5.3	DIE GENOMISCHE ORGANISATION VON KIAA0592 IST KONSERVIERT	157
5.4	DIE EXPRESSION VON KIAA0592	160
5.5	DER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN RISP, CRM1 UND REV	162
5.6	DIE LOKALISATION VON RISP UND DEREN EINFLUSS AUF HIV-1 REV	167
5.7	AUSBlicKE.....	177
 ANHANG		
ZUSAMMENFASSUNG		I
LEBENS LAUF		III
DANKSAGUNG.....		V
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....		IV
LITERATURVERZEICHNIS		IX

1 Einleitung

1.1 Das humane Immundefizienzvirus – HIV

Als potenzieller Krankheitserreger wurde das Retrovirus LAV im Jahre 1983 zuerst von L. Montagnier und Kollegen (Barre-Sinoussi et al., 1983) isoliert und charakterisiert. Parallel dazu entdeckte in den USA R. Gallo das gleiche Retrovirus, das er als HTLV III beschrieb (Gallo, Sarin, and Gelmann, 1983). Später wurde das Virus in humanes Immundefizienzvirus (HIV) umbenannt. Seit 1984 gilt HIV als ätiologische Ursache für das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS). Neben HIV-1, das hauptsächlich für die weltweite Verbreitung verantwortlich ist, wurde auch HIV-2 beschrieben, das vor allem in Westafrika verbreitet ist und einen langsameren Krankheitsverlauf verursacht (Clavel et al., 1986). Hoch aktive, antivirale Kombinationstherapien (HAART) führen heutzutage zu einer verlängerten Überlebenszeit, eine Heilung oder Impfung ist jedoch bislang und voraussichtlich auch in den nächsten Jahren nicht möglich. Zudem ist die kostenintensive Therapie in vielen Ländern der Welt für den größten Teil der Bevölkerung nicht finanzierbar.

1.2 Klassifikation und Morphologie des HI-Virus

1.2.1 Klassifikation

Die Retroviridae sind in sieben Genera, nämlich in α -, β -, γ -, δ -, ε -Retroviren, in Lentiviren und Spumaviren eingeteilt. Die Unterteilung erfolgte anhand der Besonderheiten während der Infektion und den durch sie verursachten Erkrankungen sowie nach morphologischen und genetischen Unterschieden der Viren. Retroviren kommen überwiegend bei Wirbeltieren vor, wo sie viele verschiedene Symptome hervorrufen (Tumorerkrankungen, Immundefizienzen, neurologische Defekte, jedoch auch völlig harmlose Infektionen).

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) zählt neben den Immundefizienzviren der Affen (SIV), der Katze (FIV) und des Rindes (BIV), dem Maedi-Visna-Virus (MVV) der Schafe, dem Virus der infektiösen Anämie bei Pferden (EIAV) und dem caprinen Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV) zu der Gruppe der Lentiviren. HIV ist ein exogenes, nicht onkogenes Retrovirus, das mit dem Immunsystem und dem Zentralnervensystem assoziiert ist (Modrow, 2003).

1.2.2 Morphologie und Genetik

Das HI-Virus ist ein sphärischer Partikel (Abb. 1.2.1) mit einem Durchmesser von ca. 110 nm, das von einer Lipidhülle umgeben ist, die das Virus bei der Ausknospung von der Wirtszellmembran mitnimmt. Folglich sind in die Hülle neben viralen auch wirtszellspezifische Oberflächenproteine eingelagert (Arthur et al., 1992).

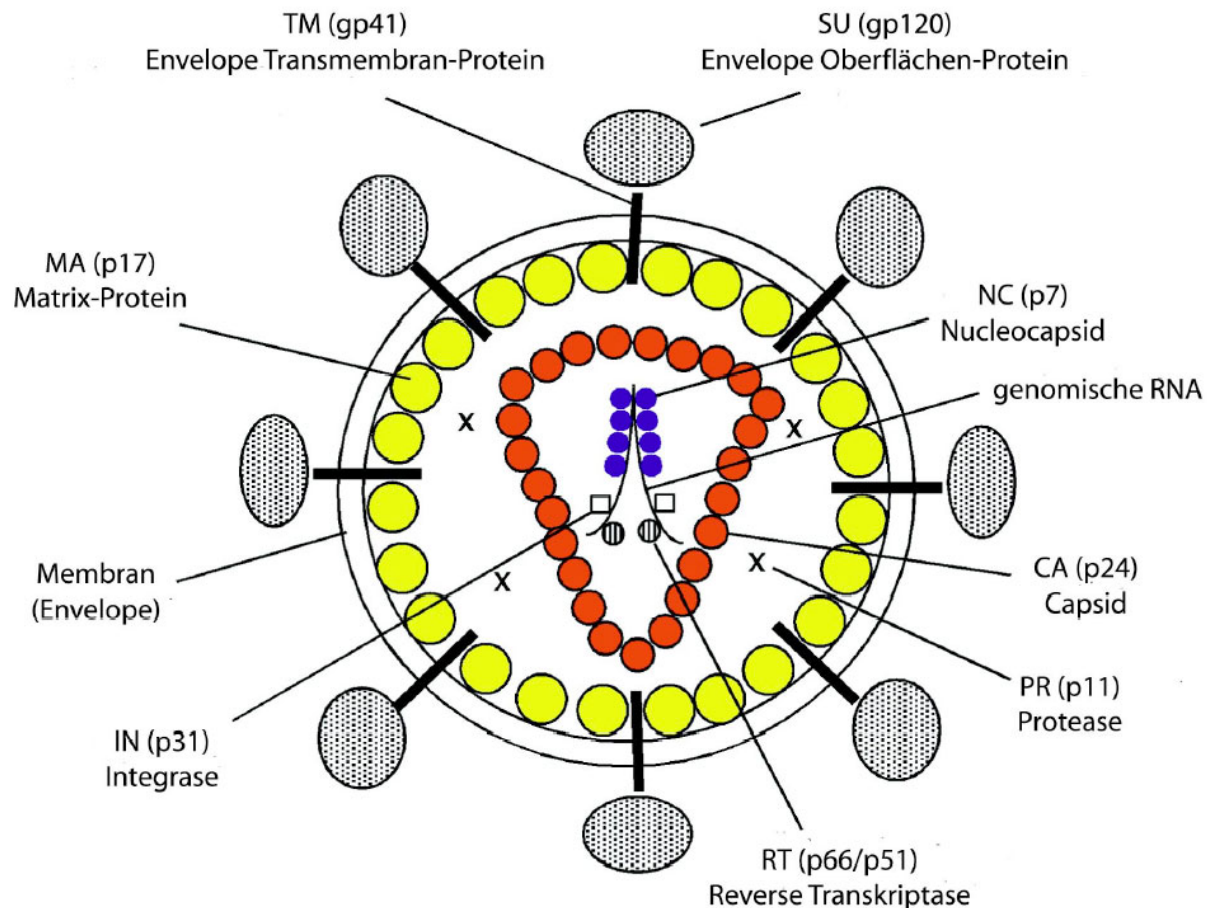


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung des HIV-Partikels mit Zuordnung der einzelnen HIV-Proteine, die im Kapsid vorhanden sind (Modrow, 2003).

Das virale Oberflächenprotein (SU, gp120) ist über Wechselwirkungen mit dem Transmembranprotein (TM, gp41) in der Virusmembran verankert, während das Matrixprotein (MA, p17) an der inneren Seite der Virusmembran lokalisiert ist und dem Virus seine rundliche Form gibt. Im konischen Kapsid, das vom Kapsidprotein (CA, p24) gebildet wird, befindet sich das virale Genom in Form zweier identischer, einzelsträngiger RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 9 kb. Diese RNA wird durch Bildung eines Ribonukleoproteinkomplexes mit dem Nukleokapsidprotein (NC, p7) stabilisiert. Im Kapsid sind außerdem neben den essentiellen, viral kodierten Enzymen

Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) die Proteine Nef, Vif, Vpr und p6 enthalten. Die drei Proteine Rev, Tat und Vpu konnten bisher nicht im reifen Viruspartikel nachgewiesen werden (Turner and Summers, 1999), (Frankel and Young, 1998).

Das virale Genom (Abb. 1.2.2) enthält neun offene Leserahmen (ORF), die für insgesamt 15 Proteine kodieren. Am 5' und 3' Ende befinden sich die „long terminal repeats“ (LTR), die zum einen als viraler Promotor fungieren (5' LTR), zum anderen die Transkription terminieren (3' LTR). Die für die Proteine Tat, Nef, Vif, Vpr und Rev ebenso wie Env kodierenden mRNAs werden durch einen komplexen alternativen Spleißweg gebildet (Bilodeau et al., 2001; Bilodeau, Domsic, and Stoltzfus, 1999; Tange et al., 2001; Tange and Kjems, 2001). Die allen Retroviren gemeinsamen Polyproteine Gag, Pol und Env werden von drei ORFs auf einfach oder ungespleißter mRNA kodiert. Gag wird im Lauf des Replikationszyklus proteolytisch in MA, CA, NC und p6 gespalten, aus Env gehen die Proteine SU und TM mit einem Signalpeptid hervor und Pol ist das Vorläuferprotein für die viralen Enzyme (PR, RT und IN (Frankel and Young, 1998)).

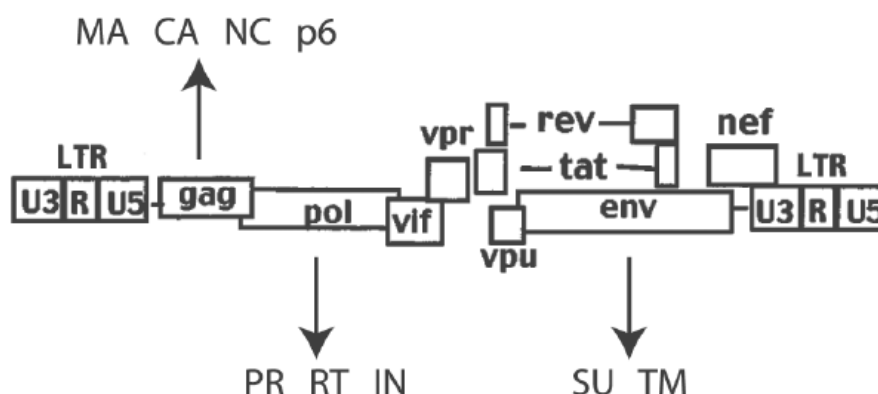


Abbildung 1.2.2: Das Genom von HIV im Überblick angelehnt an (Frankel and Young, 1998). In Balken sind die neun offenen Leserahmen flankiert von den LTR-Regionen dargestellt. Falls ein ORF (wie gag, pol und env) für mehrere Proteine kodiert, so sind diese separat aufgeführt. Die Bestandteile des Genoms sind ausführlich im Text erklärt.

1.3 Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Proteinen und RNA

Der Austausch von Molekülen zwischen dem Kern und dem Zytoplasma ist in einer eukaryotischen Zelle notwendig, v.a. um die im Zellkern abgelesenen mRNA-Transkripte ins Zytoplasma, den Ort der Translation zu bringen und Proteine, die an der Transkription beteiligt sind oder mit der genomischen DNA assoziiert sind, in den

Zellkern zu transportieren. Der Transport erfolgt dabei durch die Kernporen. Man unterscheidet passive Diffusion und aktiven rezeptorvermittelten Transport. Die beschriebenen Grenzgrößen der ungehinderten und unregulierten Diffusion betragen dabei zwischen 40 und 70 kDa Molekulargewicht und 90 Å (= 9 nm) Durchmesser eines globulären Proteins (Adam, 2001; Gorlich and Kutay, 1999). Alle Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren, die größer sind, müssen demnach über aktive Transportwege verschoben werden. Die für den aktiven intrazellulären Transport verantwortlichen Prozesse sind hoch komplex und bestehen aus einer Vielzahl von Einzelabläufen, an denen verschiedenste Proteingruppen beteiligt sind (Görlich, 1997; Gorlich and Kutay, 1999; Görlich and Mattaj, 1996; Ribbeck and Gorlich, 2001; Talcott and Moore, 1999).

Die Abbildung 1.3.1 zeigt vereinfacht die am Kernexport und Kernimport beteiligten Hauptproteine, deren Weg, deren Interaktionen untereinander und die zu transportierende Ladung.

Beim Export von Proteinen aus dem Zellkern (Abb. 1.3.1 B) bindet zunächst der Exportfaktor Crm1 (=Exportin 1, =Xpo1, blau) an ein leucinreiches Kernexportsignal (NES (Fornerod et al., 1997b)) des zu transportierenden Proteins (Abb. 1.3.1 grün). Der Transport wird durch Interaktionen des Exportins mit den Nukleoporinen des Kernporenkomplexes (NPC (Ohno, Fornerod, and Mattaj, 1998)) vermittelt. Die Bindung der GTPase Ran liefert durch die von ihr initiierte Hydrolyse von GTP in GDP die für den Transport notwendige Energie. Die Verteilung von RanGDP/RanGTP im Nukleus bzw. Zytoplasma bestimmt die Richtung des Transports. Während im Zellkern viel RanGTP (Abb. 1.3.1 orange) und wenig RanGDP (Abb. 1.3.1 grau) vorhanden ist, liegt im Zytoplasma das umgekehrte Verhältnis vor. Für die Aufrechterhaltung dieses Gradienten sind u.a. die zellulären Faktoren GEF („guanine nucleotide exchange factor“) im Nukleus und RanGAP („RanGTPase-activating protein“) und RanBP1 („Ran-binding protein 1“) im Zytoplasma verantwortlich (Pollard and Malim, 1998). Im Zytoplasma erfolgt die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP, gefolgt von einer Dissoziation des Exportkomplexes. RanGDP wird energieunabhängig in den Zellkern reimportiert und unter Hilfe von GEF wieder zu RanGTP umgewandelt (Floer and Blobel, 1999).

Beim Kernimport von Proteinen (Abb. 1.3.1 A) bindet ein heterodimerer Proteinkomplex aus Importin α und β (Moroianu et al., 1995) an die aus basischen Aminosäureverbänden bestehende NLS-Sequenz des „Cargo“-Proteins (Dingwall and Palacios, 1998; Garcia-Bustos, Heitman, and Hall, 1991). Importin α und β gehören der Importin β Familie an. Die Importin α -Untereinheit bindet an die NLS (Imamoto et al., 1995), wonach die β -Untereinheit die Verbindung an Proteine des Kernporenkomplexes, den Nukleoporinen, herstellt (Adam and Gerace, 1991).

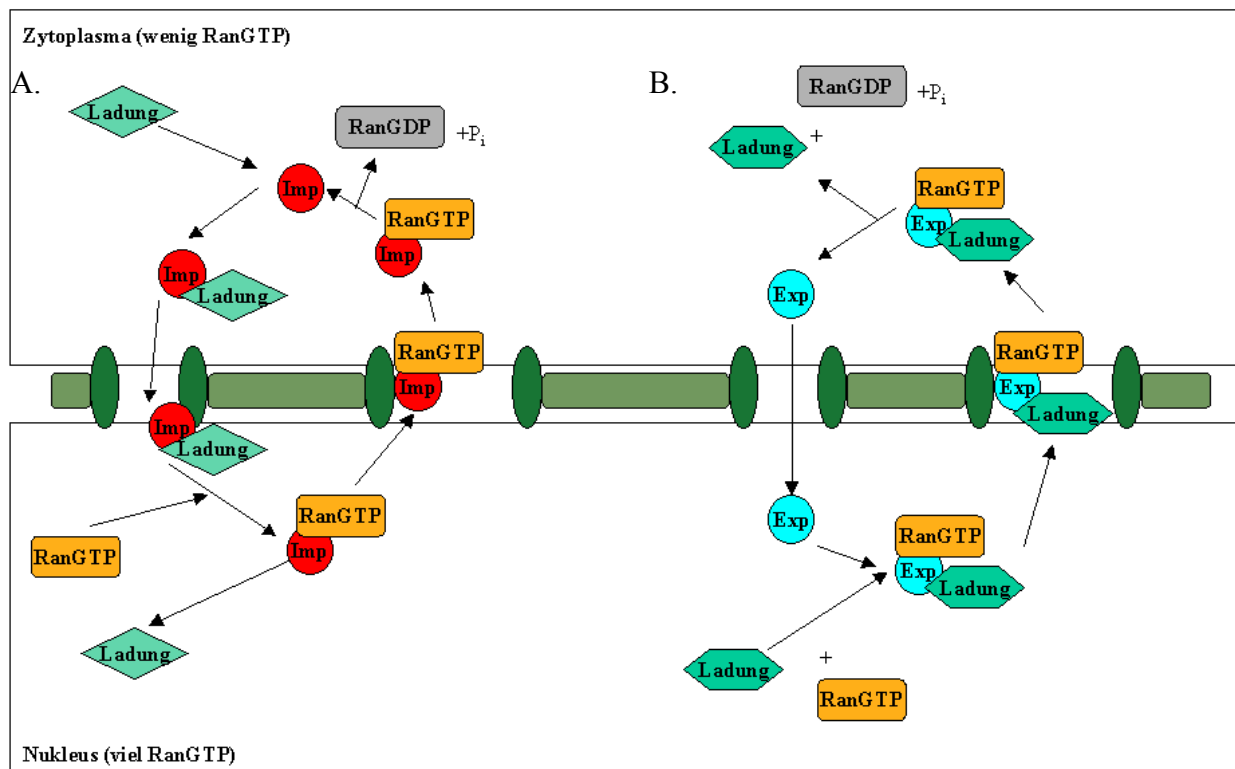


Abbildung 1.3.1: Schematisch-vereinfachte Übersicht der Abläufe des nukleozytoplasmatischen Transportes. Der durch Importin (Imp) vermittelte Kernimport (links) läuft gegen den RanGTP-Gradienten ab, der durch Exportin (Exp) vermittelte Kernexport (rechts) bewegt die Ladung hin zum RanGTP-ärmeren Zytoplasma. Die Transportproteine (Exp, Imp) sowie das RanGTP/RanGDP-Paar pendeln hierzu zwischen Zytoplasma und Kern und werden wiederverwendet.

Diese verfügen über bestimmte Peptidwiederholungen, welche sie zur Bindung befähigen (Gorlich et al., 1995; Moroianu et al., 1995). Während der Translokation durch die Kernpore dissoziiert der Importin- $\alpha\beta$ -NLS-Komplex, Importin α und das NLS-Protein akkumulieren im Kernplasma. Importin β akkumuliert an der Kernpore (Gorlich et al., 1995; Moroianu et al., 1995). Die Hydrolyse von RanGTP wird für diese Translokation benötigt (Melchior et al., 1993). Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, wie der RanGTP-Zyklus im NLS-Proteinimport umgesetzt wird. Wie beim Kernexport ist die Verteilung von RanGTP/RanGDP im Zytoplasma und dem Zellkern wichtig für die Translokation. RanGTP bindet den Importin- $\alpha\beta$ -NLS-Komplex an der Innenseite der Kernpore und führt zu dessen Auflösung (Chi et al., 1996; Nehrass and Blobel, 1996; Rexach and Blobel, 1995) und der Freisetzung des NLS-Proteins in den Kern. Die beiden Importin-Untereinheiten werden auf verschiedenen Wegen zurück ins Zytoplasma geschafft. Importin β besitzt ein leucinreiches NES und wird in Verbindung mit RanGTP dadurch in das Zytoplasma transportiert (Iovine and Went,

1997). Die α -Untereinheit benötigt RanGTP und möglicherweise ein weiteres Mitglied der Importin β -Familie als Transporter, um wieder ins Zytoplasma exportiert zu werden (Koepp et al., 1996; Kutay et al., 1997, Koepp, 1996 #877). Für bestimmte Proteine, wie beispielsweise HIV-1 Rev und HTLV-I Rex, die eine argininreiche NLS enthalten, wurden Importin β -vermittelte, jedoch Importin α -unabhängige Kernimportvorgänge beobachtet (Palmeri and Malim, 1999; Truant and Cullen, 1999). Die Importine werden synonym auch als Karyopherine bezeichnet.

Eine ausführliche Zusammenfassung über die einzelnen Transportmechanismen und alle bekannten, am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligten Proteine bietet die Publikation von Görlich und Kutay aus dem Jahr 1999 (Görlich and Kutay, 1999).

1.4 HIV-1 Rev – „Regulator of Expression of Virion Genes“

HIV muss, wie viele Viren, ausgehend von einem relativ kleinen Genom mit nur einem Promotor viele verschiedene Proteine exprimieren. Dies geschieht im Fall von HIV u.a. durch alternatives Spleißen. Das bedeutet, dass auch mRNAs, die noch Introns enthalten, vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden müssen. In der Regel werden in eukaryotischen Zellen nur gespleißte Transkripte in das Zytoplasma zur Translation exportiert (Sharp, 1988). Obwohl auch alternatives Spleißen beobachtet werden konnte (Black, 2003; Kornblihtt et al., 1996), werden nicht vollständig gespleißte mRNA normalerweise im Zellkern zurückgehalten, bis entweder alle Introns entfernt worden sind oder die RNA durch zelluläre Enzyme wieder abgebaut werden. HIV bedient sich des Regulationsproteins Rev, um den Export der nur einfach gespleißten oder ungespleißten HIV mRNA zu ermöglichen.

Das regulatorische Protein Rev besteht aus 116 AS und ist damit ca. 18 kDa groß. Das Genprodukt ist hauptsächlich im Zellkern und den Nukleoli lokalisiert, kann aber auf Grund spezifischer Signalsequenzen zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und hertransportiert werden (Richard, Iacampo, and Cochrane, 1994). Man spricht deshalb von einem „Shuttle“-Protein.

Rev kann in mehrere funktionelle Domänen unterteilt werden. Zwischen AS 35 und 51 liegt eine argininreiche RNA-Bindedomäne (Bohnelein, Berger, and Hauber, 1991); (Hope et al., 1990); (Kjems et al., 1991); (Malim et al., 1990). Die AS 38-46 stellen zugleich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS (Bohnelein, Berger, and Hauber, 1991); (Cochrane, Perkins, and Rosen, 1990); (Kubota et al., 1989); (Perkins et al., 1989); (Venkatesh, Mohammed, and Chinnadurai, 1990)) dar. Die RNA-Bindungsdomäne wird von der zweigeteilten Oligomerisierungsdomäne flankiert (AS 12-29 und AS 52-60 (Malim and Cullen, 1991); (Olsen et al., 1990); (Szilvay et al.,

1997); (Thomas et al., 1998); (Zapp et al., 1991)). Am C-Terminus (AS 73-84) befindet sich eine leucinreiche Domäne, die das nukleäre Exportsignal (NES (Fischer et al., 1995)) enthält und auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet wird, da sie ursprünglich mit der Interaktion mit zellulären Proteinen in Verbindung gebracht wurde (Hope et al., 1992); (Malim et al., 1989); (Mermer et al., 1990). Eine Übersicht des Rev-Proteins mit einer Darstellung der Funktionsdomänen ist in Abbildung 1.4.1 gegeben.

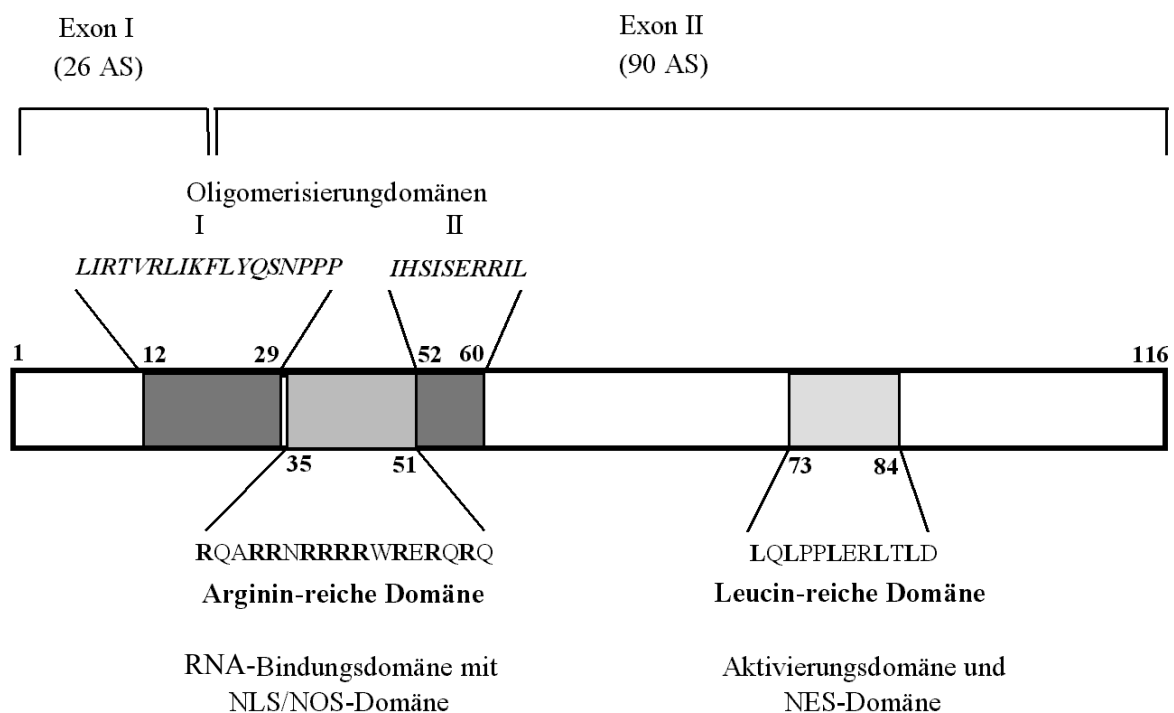


Abbildung 1.4.1: Das Rev-Protein mit seinen funktionalen Bereichen. Das Protein wird auf zwei Exons kodiert und besteht aus 116 AS: Die Aminosäurebereiche von 12-29 und 54-60 dienen der Multimerisierung. Der Bereich in der N-terminalen Hälfte von 35-51 beinhaltet die RNA-Bindungsdomäne und die NOS/NLS-Sequenz. C-terminal liegt die Aktivierungs- bzw. NES-Domäne.

Im Verlauf der frühen Phase der viralen Genexpression kommt es im Zellkern zur Akkumulation von Rev. Ist eine bestimmte Schwellenkonzentration von Rev erreicht, beginnt die späte Expressionsphase (Pomerantz, Seshamma, and Trono, 1992). Der Begriff „Schwellenkonzentration“ ist umstritten. Als gesichert gilt, dass ausreichend Rev für die Bindung an das RRE („Rev response element“) vorliegen muss. Das RRE ist eine RNA-Sekundärstruktur, die von der *env*-Region transkribiert wird und somit in allen intronhaltigen viralen Transkripten enthalten ist (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1989) (Emerman, Vazeux, and Peden, 1989). Es kommt zum Export ungespleißter und

einfach gespleißter Transkripte der 4 und 9 kb Klassen (Felber et al., 1989), die a) der Translation viraler Strukturproteine, akzessorischer Proteine und Enzyme dienen und b) als Genom in die neu entstehenden Viruspartikel verpackt werden. Der schematische Ablauf der HIV-Genexpression durch Rev ist in Abbildung 1.4.2 dargestellt.

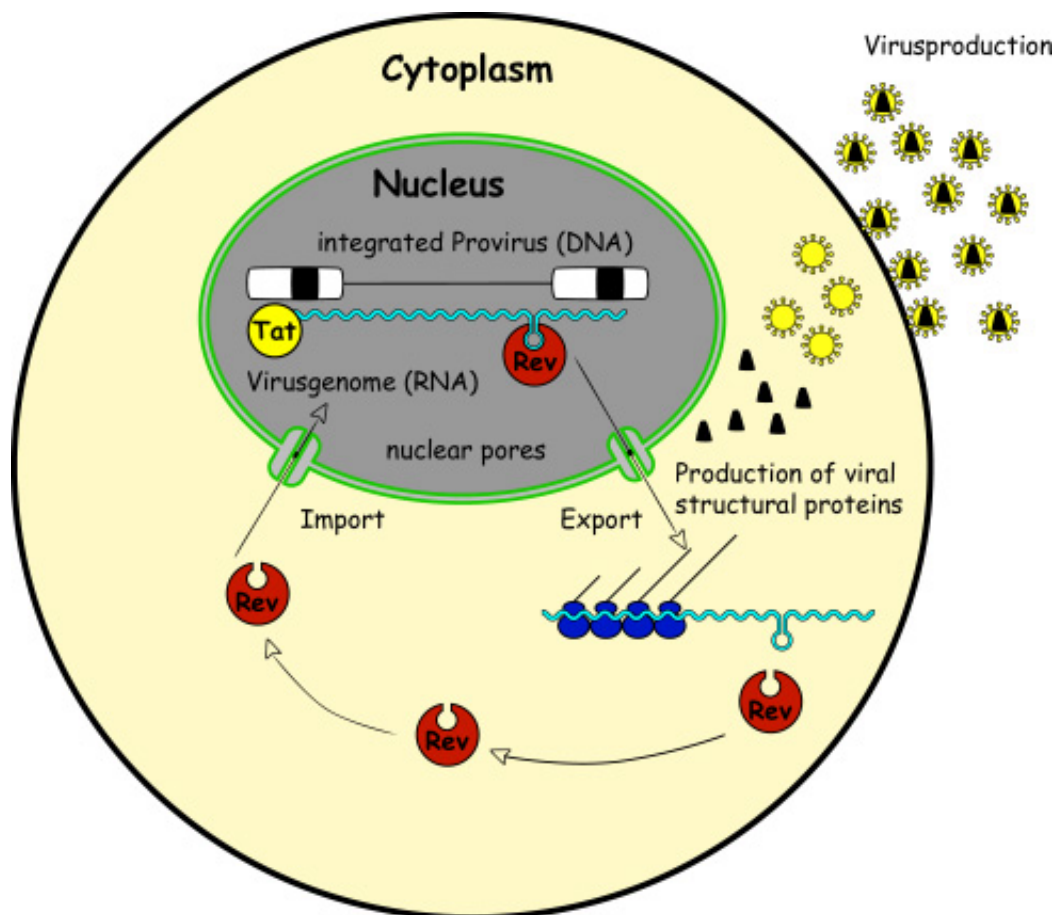


Abbildung 1.4.2: Schematische Übersicht über die Funktionsweise des HIV-1 Rev Proteins im zellulären Kontext. Dargestellt ist der Ablauf des Kernimports von Rev, dessen Bindung an das RRE und der durch Rev vermittelte Kernexport der RRE-mRNA. Ebenso ist die Wirkung von HIV-1 Tat auf die Transkription der mRNA angedeutet.

Rev bindet innerhalb der RRE an der Haarnadelschleife IIB („Stemloop“ = SL IIB). Nach einer Modellvorstellung wird durch die Bindung die Struktur der RRE destabilisiert, was die Bindung weiterer Rev-Moleküle unter Eingehen von Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht. Diese Oligomerisierung von etwa 13 Rev-Molekülen (Brice, Kelley, and Butler, 1999) ist essentiell für den Export aus dem Zellkern. Es konnte gezeigt werden, dass für den Export die Bindung eines Rev-

Monomers nicht ausreichend ist (Malim and Cullen, 1991). Für den Kernimport und die RNA-Bindung ist die gleiche AS-Sequenz verantwortlich, daher wird angenommen, dass durch die Anlagerung an die RNA das Importsignal maskiert wird und das Exportsignal dominiert (Henderson and Percipalle, 1997).

Der aktive Export des Rev/mRNA-Komplexes wird durch Interaktion mit zahlreichen zellulären Komponenten vermittelt. Durch die Freisetzung der RNA von Rev wird die NLS wieder zugänglich. Importin β bindet direkt an diesen argininreichen Bereich (Henderson and Percipalle, 1997; Truant and Cullen, 1999). Im Gegensatz zu vielen anderen importierten Proteinen ist hier kein Importin α als Adapter-Molekül zwischen Importin β und dem zu transportierenden Protein nötig. Die Assoziation von Rev mit RanGTP im Zellkern bewirkt die Freisetzung von Rev, das wieder eine neue mRNA bindet (Truant and Cullen, 1999).

Neben der Funktion von Rev für den Export von ungespleißter RNA wurde auch beschrieben, dass Rev für Bildung von Polysomen an *gag/pol*- und *vpu/env*-mRNA und somit für effiziente Translation nötig ist (D'Agostino et al., 1992).

Zwei weitere Signalsequenzen sind für HIV-1 Rev beschrieben worden. Einmal ein sogenanntes nukleoläres Lokalisationssignal (NOS) (Hope et al., 1990); (Kubota et al., 1989), welches mit der NLS-Sequenz überlappt. Diese Signalsequenz soll neben der nukleären zusätzlich zu einer nukleolären Lokalisation von Rev führen, wird allerdings in der Literatur nur vereinzelt erwähnt. Die Bindung an andere nukleoläre Proteine kann ebenso zu dieser speziellen Lokalisation führen, ohne dass ein gesondertes Signal nötig wäre. NOS wurden auch für andere zelluläre Proteine, wie zum Beispiel bestimmte Hitzeschockproteine beschrieben, in welchen diese Signale durch stress- oder hitzeabhängige Änderung der Proteinkonformation zugänglich werden (Hatanaka, 1990). Noch kontroverser diskutiert wird das Vorhandensein eines sogenannten Kerndiffusionsinhibitions-Signals (NIS), welches aus den Aminosäuren 10 bis 24 von Rev besteht (Fang, Kubota, and Pomerantz, 2002). Dieses Signal soll die passive Diffusion von kleinen Molekülen in den Zellkern hemmen und es soll zu einer stabilen Kernlokalisation einer NOS/NLS-defizienten Rev-Mutante führen. Eine Mutante dieser NIS-Sequenz (Rev_{d23}) selbst wurde als potenter transdominant negativer Inhibitor der Funktion von wildtypischem Rev beschrieben.

Als eine weitere transdominant negative Mutante der Proteinsequenz von Rev wurde M10bl beschrieben (Malim et al., 1989; Stauber, Gaitanaris, and G, 1995). Hier liegen insgesamt sechs zum Wildtyp unterschiedliche Aminosäuren in dem Bereich der Aktivierungsdomäne bzw. der NES vor.

Weiterhin veranlassen die unterschiedlichen Ergebnisse über die Funktionalität von Rev in adulten Astrozyten Diskussionen. Zum einen wurde publiziert, dass in Astrozyten durch eine verminderte Funktion von Rev nur eine stark verringerte Menge an viralen Strukturproteinen gebildet wird (Neumann et al., 1995). Zum anderen wird

behauptet, dass Astrozyten unter bestimmten Bedingungen zu einer normalen Virusreplikation fähig sein können (Canki et al., 2001).

Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen über die Sequenz und die Funktion von Rev sind bislang noch essentielle Fragen unbeantwortet und unterschiedliche Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

1.5 Die Interaktion von HIV-1 Rev mit zellulären Faktoren als Ansatz für die Entwicklung von HIV-Inhibitoren

Die Problematik der HIV-Therapie ergibt sich aus der Tatsache, dass das Virus zum großen Teil auf zelluläre Funktionen zurückgreift, die nur bedingt als Therapieziele dienen können. Die Rev- (und auch Tat-) Funktionen sind sehr virusspezifisch und deshalb interessant als Angriffspunkte. Bisher beschriebene HIV-Inhibitoren von Rev (oder Tat) basieren zumeist auf aromatischen Kationen (Xiao et al., 2001), Aminoglykosidantibiotika (Hamasaki and Ueno, 2001; Sreedhara and Cowan, 2001; Tok, Dunn, and Des Jean, 2001) oder auf gekapselter RRE-antisense-RNA (Duzgunes et al., 2001) und Rev-Peptidkonjugaten (Baker et al., 2000; Kumagai et al., 2000; Kumagai et al., 2001; Takahashi, Ueno, and Mihara, 2001). Diese Komponenten binden spezifisch an RRE-RNA und verhindern dort die Proteinbindung oder führen zum Abbau der RNA. Virusspezifische Inhibitoren werden oft durch die Fähigkeit des Virus, sich durch Mutationen anzupassen, in ihrer Wirkung beeinflusst. Inhibitoren von allgemeinen Stoffwechselwegen beeinflussen infizierte und gesunde Zellen gleichermaßen und können zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Deshalb ist die Suche nach Proteinen und Stoffwechselwegen, die in direktem Kontakt mit virusspezifischen Proteinen wie Rev stehen, wichtig, um weitere Angriffspunkte im viralen Vermehrungszyklus zu ermitteln.

In seinem Funktionszyklus durchläuft HIV-1 Rev verschiedene kritische Punkte, an welchen es mit unterschiedlichen zellulären Proteinen interagiert. Um seine Hauptfunktion, den Export ungespleißter mRNA aus dem Kern, durchführen zu können, muss Rev nach der Translation im Zytoplasma in den Kern importiert werden. Rev enthält dazu ein Kernlokalisierungssignal (NLS).

Importin β bindet direkt an die NLS von Rev (Henderson and Percipalle, 1997; Truant and Cullen, 1999). Diese Untersuchungen zeigten, dass Rev an der viralen RNA multimerisiert und dadurch die NLS-Sequenz verdeckt ist und die NES-Sequenz offen liegt. Dies sorgt dafür, dass erst nach dem Export und der Freisetzung der RNA-Ladung im Zytoplasma Rev wieder importiert werden kann.

Das nukleoläre Protein B23 ist an dem Vorgang der Bindung von Rev an Importin β beteiligt und bindet Rev auch direkt (Miyazaki et al., 1995). Dadurch wird der Import

von Rev weiter stimuliert (Szebeni et al., 1997; Szebeni and Olson, 1999). Für B23 wird postuliert, dass es zwischen dem Zytoplasma und dem Kern pendelt und am Transport ribosomaler Komponenten beteiligt ist (Borer et al., 1989). Vermutlich trägt B23 in der Zelle zur Einstellung der nukleolären Funktionen und zum Abbau der Nukleoli während der Mitose bei. Eine Rev-Überexpression führt zu einem Aufblähen und zu strukturellen Deformationen der Nukleoli und hat eine unnatürliche Anhäufung von rRNA zur Folge (Miyazaki, Nosaka, and Hatanaka, 1996). Rev führt außerdem zu einer Akkumulation von Zellen, welche in G2-, Prophase oder Mitose arretieren, ohne eine Zytokinese zu durchlaufen (Miyazaki, Nosaka, and Hatanaka, 1996). Dies lässt den Schluss zu, dass Rev eine erfolgreiche Mitose der infizierten Zellen hemmt oder sogar verhindert. Dies steht in direktem Gegensatz zur Funktion von B23 und würde eine Erklärung der Bindung liefern. Eine selektive Hemmung der Bindung von Rev an Importin β oder B23 durch Medikamente würde so möglicherweise den Import von Rev in den Zellkern verhindern und Rev würde den Ort seiner Funktion nicht erreichen.

Einmal im Kern angelangt verhindert Rev das vollständige Spleißen der HIV-1 mRNA durch die Bindung an das RRE (Fankhauser et al., 1991). Diese Bindung und die Multimerisierung von Rev (Jain and Belasco, 2001) verdrängen B23. Durch eine Phosphorylierung von Rev durch die Caseinkinase 2 (CK2) *in vitro* wird die Bindung an das RRE verstärkt (Fouts et al., 1997). Diese Kinase phosphoryliert außerdem B23, was zusätzlich zu einer Verstärkung des Rev-Imports durch den Einfluss von B23 führt (Szebeni et al., 1997). Die CK2 selbst wird durch Rev *in vitro* aktiviert, was zu einer verstärkten Phosphorylierung verschiedener HIV-1 Proteine, wie gp120, gp41, p51, p32, p27 und p24 führt (Ohtsuki et al., 1998).

Auf Grund ihres Einflusses auf Rev und auf andere HIV Proteine könnte auch die Caseinkinase 2 ein Angriffspunkt zur HIV-1 Therapie sein. Die Caseinkinase 2 greift durch Phosphorylierung verschiedener HIV-Proteine wahrscheinlich sogar mehrfach in die Abläufe der HI-Virusvermehrung ein. Die Multimerisierung von Rev an der RRE-mRNA ist essentiell für die Rev-Funktion und ist somit selbst ein potenzielles Ziel eines medikamentösen Eingreifens.

Die Fähigkeit, das Spleißen der HIV-mRNA zu verhindern, hängt möglicherweise mit der Bindung von Rev an das ASF/SF2-spleißfaktorassoziierte Protein p32 zusammen (Tange, Jensen, and Kjems, 1996). P32 moduliert die Funktion von Rev und wird als Verbindung zum zellulären Spleißapparat angesehen. Für den Spleißfaktor ASF/SF2 selbst wurde gezeigt, dass er an die RRE-RNA im Beisein von Rev binden kann und die Rev-Funktion dosisabhängig inhibieren kann (Powell et al., 1997). Die Interaktion von Rev mit p32 könnte diese Inhibition verhindern bzw. aufheben. Weitere Proteine wurden im Zusammenhang mit der Verhinderung des Spleißens und der Stabilisierung der viralen RNA durch Rev identifiziert. Dazu gehören serin- und argininreiche

Proteine, die der Erkennung der Spleißstellen dienen (Pongoski, Asai, and Cochrane, 2002) und das heterogene, nukleäre Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1) (Najera, Krieg, and Karn, 1999). Durch einen positiven Einfluss von Rev auf die Bindung des poly(A)-Bindungsproteins 1 (PAB 1) an die poly(A)-Enden der HIV-mRNA (Campbell et al., 1994) wird die Stabilität erhöht und die Translation der HIV-1 mRNA findet vermehrt statt.

Zum Export der mRNA aus dem Kern muss Rev mit verschiedenen zellulären Proteinen interagieren. Zuerst identifiziert wurde der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A), welcher mit Rev (Ruhl et al., 1993) und auch mit Crm1 (Rosorius et al., 1999) direkt interagiert. Die Interaktion von eIF5A mit Rev ist notwendig für die Bindung von Rev an Crm1 (Hofmann et al., 2001). Crm1 ist im Zusammenspiel mit eIF5A als Interaktionspartner von Rev essentiell für den Rev-vermittelten Export der viralen ungespleißten mRNA aus dem Kern. Dies lässt die Entstehung eines Komplexes der drei Proteine vermuten, der essentiell für die Virusvermehrung ist und deshalb ebenfalls als Ziel für die Inhibitorentwicklung zu sehen wäre, da. Das ribosomale Protein L5, ein Teil des 5s rRNA-Exportsystems, scheint ebenso an diesem Prozess beteiligt zu sein. Es wurde eine Interaktion von L5 mit eIF5A und dadurch eine Verstärkung der Rev-Aktivität gezeigt (Schatz et al., 1998).

Weitere zelluläre Faktoren sind mit dem für Rev beschriebenen Crm1-abhängigen Kernexportmechanismus verbunden. Darunter sind Bestandteile des Kernporenkomplexes (Zolotukhin and Felber, 1999), im Kern vorliegendes Aktin (Hofmann et al., 2001), das 68kDa-Src-assoziierte Protein der Mitose (Sam68) (Li et al., 2002b), die Sam68-ähnlichen Proteine SLM-1 und 2 (Reddy et al., 2002), die RNA-Helikase A (RHA) (Li et al., 1999) und Tap (Reddy et al., 1999). Sam68 bindet direkt an Rev, kann aber auch im Zusammenspiel mit Tap und RHA den Export der RRE-mRNA ohne Rev selbstständig ausführen.

Die Liste der Rev-interagierenden zellulären Faktoren (Tab 1.5.1) wurde in den letzten Jahren nicht mehr vergrößert. Die hier genannten Faktoren wurden alle bis 1999 beschrieben.

zelluläre Rev-interagierende Faktoren	Identifikationsmethode	Quelle	Interaktionsbereich	funktionell beteiligt an	Referenz
B23 (nukleolär)	Affinitätschromatographie	HeLa	basische Domäne von Rev und Tat	Chaperon, nukleolärer Import	(Fankhauser et al., 1991; Szebeni and Olson, 1999)
eIF-5A (zytoplasmatisch und nukleär)	cross-linking	HeLa	Aktivierungsdomäne von Rev und Rex	Kernexport, Translation	(Bevec et al., 1996; Ruhl et al., 1993)
YL2 /p32 (primär mitochondrial)	Y2H Co-IP footprinting, i.v.	murines Embryogewebe	basische Domäne von Rev und Rex	Spleißen, HIV Transkription	(Luo, Yu, and Peterlin, 1994; Tange, Jensen, and Kjems, 1996)
Nukleoporine: (nukleär, Kernpore) hRip = Rab yRip1p1 = Nup42 Nup98, Nup153, Nup214 NLP-1	Y2H, M2H, i.v.	HeLa, CEM-T Zellen, Hefe	Aktivierungsdomäne von Rev und Rex	Kernexport	(Bogerd et al., 1995; Farjot, Sergeant, and Mikaelian, 1999; Fritz and Green, 1996; Fritz, Zapp, and Green, 1995; Stutz et al., 1996; Stutz, Neville, and Rosbash, 1995; Zolotukhin and Felber, 1999)
Crml/Exportin 1 (nukleär)	Y2H, co-IP, i.v.	Hefe, Mensch	Aktivierungsdomäne von Rev und Rex	Kernexport	(Fornerod et al., 1997b; Neville et al., 1997)
Importin β (zytoplasmatisch)	i.v.	human	basische Domäne von Rev, Rex und Tat	Kernexport	(Henderson and Percipalle, 1997; Palmeri and Malim, 1999; Truant and Cullen, 1999)

Tabelle 1.5.1: Bekannte zelluläre Interaktionspartner von HIV-1 Rev. Die Spalten zeigen den Namen, die Methode der Identifikation (Y2H = Hefe 2-Hybridsystem, M2H = Säuger 2-Hybridsystem, i.v. = *in vitro* Bindung, Co-IP = Koimmunopräzipitation), die Gewebe- oder Zellquelle, den Interaktionsbereich, den möglichen Einfluss auf Rev und die Literaturstellen (angelehnt an (Ceccherini-Silberstein, 2001)).

1.6 Das „Rev Interacting Shuttle Protein“(RISP) und das zelluläre KIAA0592-Protein

In einer früheren Arbeit (Ceccherini-Silberstein, 2001) wurde durch ein Screening mittels eines Hefe 2-Hybridsystems ein neuer Rev-interagierender Faktor (=Klonnummer 16.4.1) identifiziert. Die kodierende DNA-Sequenz stammte aus einer Jurkat T-Zell cDNA-Bank und war 696 bp groß. Die Herstellung von cDNA-Banken durch reverse Transkription (RT) mit oligo(dT)-Primern hat zur Folge, dass es durch

Abbruch der RT-Reaktion inmitten einer größeren mRNA zu unvollständigen cDNA-Fragmenten kommen kann. Schon bald wurde durch Vergleichsuntersuchungen auf Sequenzebene festgestellt, dass die Nukleotid- und Proteinsequenz des Klon 16.4.1 vor allem mit dem 3' bzw. C-terminalen Ende des publizierten KIAA0592-cDNA-Klons/Proteins übereinstimmt.

Die KIAA0592-Sequenz wurde aus einer cDNA-Bank des menschlichen, adulten Gehirns durch spezielle Methoden zum Nachweis von großen Transkripten identifiziert (Nagase et al., 1998a; Nagase et al., 1998b; Ohara et al., 1997). Hierzu wurden cDNA-Banken aus dem menschlichen Gehirn und anderen Geweben hergestellt und so der Größe nach fraktioniert, dass die Banken eine durchschnittliche cDNA-Größe von 3,3 bis zu 10 kbp zeigten. Diese cDNA wurden dann auf kodierende Regionen hin untersucht und in eine Datenbank eingegeben. Die Daten und die cDNA sind für die wissenschaftliche Forschung zugänglich. Bis zum heutigen Tag wurden auf diese Weise über 2000 (KIAA0001-KIAA2029) neue, große (>50 kDa) zelluläre Proteine identifiziert. Weitere Informationen finden sich in der HUGE-Datenbank des Kazusa, DNA-Forschungsinstituts, Japan (<http://www.kazusa.or.jp/huge> (Kikuno et al., 2002)).

Die cDNA von KIAA0592 (Accession #AB011164 (Nagase et al., 1998a)), obwohl ebenfalls als unvollständig eingestuft, hat eine Gesamtlänge von 4623 bp und kodiert theoretisch für ein Protein von 1353 AS (Accession #BAA25518). Die KIAA0592-Sequenz wurde am 10. April 1998 publiziert.

Das publizierte KIAA0592-Protein wurde durch eine *in silico* Translation eines möglichen offenen Leserahmens ermittelt. Das Protein ist bis heute weder mit einer Funktion noch einer Struktur beschrieben. Die Proteinsequenz wurde als ebenfalls 5' unvollständig annotiert. Die cDNA besitzt ein Polyadenylierungssignal und der offene Leserahmen ist ununterbrochen. Durch RT-PCR-Versuche wurde das KIAA0592-Transkript in den folgenden Gewebearten identifiziert: Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Muskel, Nieren, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovarien und dem Dünndarm. Die *Ensemble* Identifikationsnummer lautet Q9Y4E1. Die Sequenz wurde experimentell auf das menschliche Chromosom 10 kartiert.

Für den Klon 16.4.1, der später den Arbeitsnamen Risp bekam, wurden einige charakteristische Eigenschaften ermittelt (Ceccherini-Silberstein, 2001). So sind die Aminosäuren 39 bis 133 von Risp und die Aminosäuren 34 und 60 von Rev wichtig für die Bindung der beiden Proteine aneinander. Erste Versuche zeigten, dass sich Risp in HeLa-Zellen vornehmlich im Zytoplasma aufhält, aber auch im Kern zu finden ist. Verschiedene Astrozytom-Zelllinien zeigten ein inhomogenes Lokalisationsmuster des Risp-Proteins in den Zellen, grundsätzlich zeigte sich Risp wie in HeLa-Zellen vornehmlich im Zytoplasma angesiedelt. Dies könnte auch auf die generell inhomogene Morphologie dieser Zellkulturen (85HG66 und U138 MG)

zurückzuführen sein. Durch einen Vergleich der Risp-Proteinsequenz mit den anderen bekannten direkt mit Rev interagierenden Faktoren konnte ein gemeinsames Sequenzmotiv ermittelt werden. Die Konsensussequenz dieses Motivs (**P**[AELNR][KHILST][KCRST]**TN**[PD]**F**[LST][LIN][EAGQS]) findet sich in den Aminosäuren 12-25 des N-terminalen Endes von Risp wieder (Ceccherini-Silberstein, 2001). Die Sequenz bindet nicht direkt an Rev und somit ist die Funktion in den Rev-bindenden Faktoren und der Zusammenhang mit der Fähigkeit der Rev-Bindung noch unklar.

1.7 Vom Genom zum Proteom

Da in der vorliegenden Arbeit computergestützte Analysen eine wesentliche Rolle spielen soll hier eine kurze Einführung in das Gebiet der *in silico*-Untersuchungen und deren Voraussetzungen gegeben werden.

Das menschliche Genom besteht aus 3,2 Milliarden Basenpaaren, die auf 46 Chromosomen verteilt sind. Die nun publizierte Sequenz des menschlichen Genoms stellt wohl computerwissenschaftlich gesehen eher einen Anfang anstatt ein Ende dar. Erst jetzt ist es möglich, detailliert Sequenzpolymorphismen und die gesamte Komplexität des sogenannten „Transcriptoms“, also der Gesamtheit aller transkribierten Sequenzen, oder letztlich des sogenannten „Proteoms“, das bedeutet aller vom Genom kodierten Proteine, zu untersuchen.

Genomische Sequenzen können funktional in Gene, Pseudogene, nicht-kodierende und regulatorische Bereiche getrennt werden. Nur ein geringer Teil (1,5-3 %) des gesamten Genoms besteht aus Bereichen, welche direkt für eine Aminosäuresequenz kodieren. Ein nicht unwesentlicher Teil des Genoms besteht aus Pseudogenen (0,5 %), das sind inaktive aber stabile Komponenten des Genoms, welche durch Mutationen aus vorher aktiven Genen entstanden sind. Der größte Bereich setzt sich aus Introns und intergenischer DNA zusammen. Fast die Hälfte der DNA besteht aus den verschiedensten Transposons, welche Nukleotidwiederholungen zeigen. Immer noch gehen die Schätzungen über die tatsächliche Anzahl an menschlichen Genen weit auseinander (Makalowski, 2001). So liegen beispielsweise die geschätzten Werte, die bei einer Lotterie angegeben wurden, die auf der Cold Spring Harbor Genomkonferenz im Jahr 2000 begann und bis 2002 lief, zwischen 27000 und 153000 Genen. Dabei lag der Mittelwert der Schätzungen bei ca. 61000 Genen (<http://www.ensembl.org/Genesweep>). Ein Sieger bzw. die Anzahl der Gene soll dieses Jahr (2003) durch Fachleute auf der gleichen Konferenz ermittelt werden.

Abbildung 1.7.1 gibt einen Überblick über die Kartierung des menschlichen Chromosom 10 mit einer Auswahl an annotierten Genen der „GenomeMap“-Zusammenstellung des NCBI.

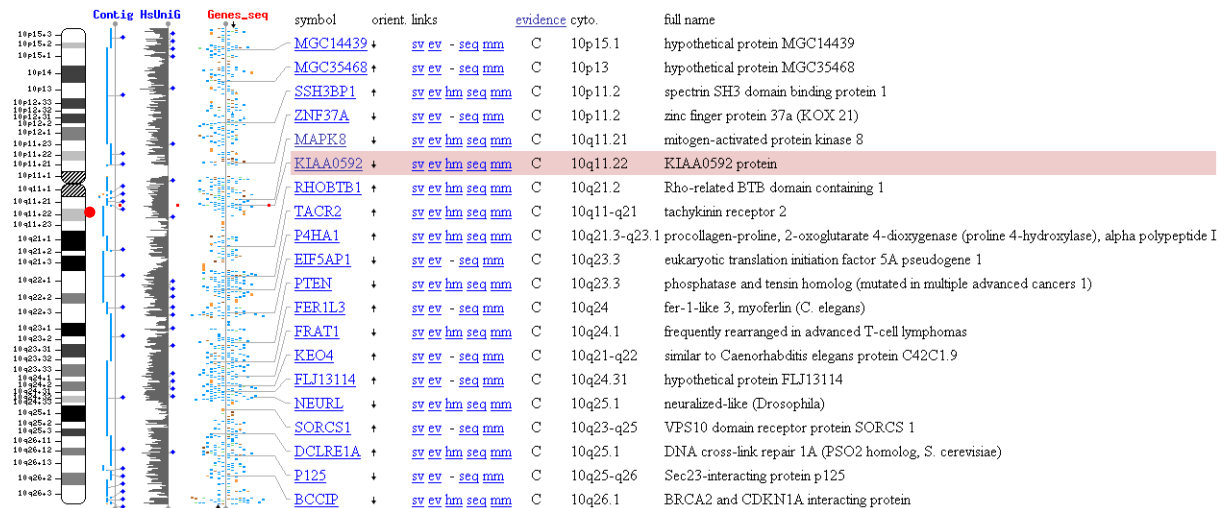


Abbildung 1.7.1: Ausschnitt einer Kartierung des menschlichen Chromosom 10 (NCBI, GenomeMap). Angegeben ist eine Auswahl an annotierten Genen mit der zugehörigen Chromosomenregion, verschiedenen Links zu weiteren Datenbanken, dem Gensymbol und der Orientierung, den UniGene- und Contig-Sequenzen und der Lokalisation auf dem Chromosom (roter Punkt).

Das Genom ist nicht nur auf Sequenzebene komplex aufgebaut, sondern auch die Chromosomen sind spezifisch lokalisiert und die DNA in den Chromosomen bildet räumliche Anordnungen. Studien an Chromosomen in der Mitose haben eine funktionell signifikante Kompartimentalisierung des Säugergenoms ergeben, welche sich stark an dem bekannten Bandenmuster orientiert (Sadoni et al., 1999). R-Bandenabschnitte werden früh in der S-Phase der Mitose repliziert, wohingegen G-Banden erst in der zweiten Hälfte der S-Phase verdoppelt werden. Konstitutiv exprimierte Gene wurden beispielsweise fast ausschließlich in den R-Banden festgestellt, wohingegen gewebespezifische Gene vorwiegend in den G-Banden zu finden waren (Craig and Bickmore, 1993; Craig and Bickmore, 1994). Die R-Bandensequenzen von unterschiedlichen Chromosomen häufen sich im Kerninneren und bilden ein Kompartiment, welches früh repliziert wird und transkriptionell kompetent und aktiv ist (Sadoni et al., 1999). Dementsprechend lokalisieren genarme Chromosomen (wie das menschliche Chromosom 18) vorwiegend in der Kernperipherie (Swedlow and Lamond, 2001). Von T. Cremer existiert ein Modell, nach dem der Nukleus in spezielle Chromosomenterritorien (CT) und Interchromatindomänen (ICD) aufgeteilt ist. Dabei stellen die ICD das strukturelle und

funktionelle Äquivalent der Kernmatrix dar. In den CT kann man Bereiche mit aktiven Genen von solchen mit inaktiven Genen unterscheiden (Cremer et al., 1996; Cremer and Cremer, 2001; Cremer et al., 2000; Cremer et al., 1993; Zirbel et al., 1993).

Neben der Organisation des Nukleus in speziell differenzierte Kompartimente sind auch die DNA-Sequenzen der Chromosomen strukturell organisiert. Das Vorhandensein einer nukleären Kompartimentalisierung und die Frage, wie unterschiedlichste Prozesse im Kern organisiert werden, führten zur Annahme einer Kernmatrix (Dundr and Misteli, 2001). Die vollständige Struktur dieser Matrix ist bisher nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (Nickerson, 2001; Nickerson, Blencowe, and Penman, 1995; Pederson, 2000). Sogenannte „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (S/MARs) der DNA führen zu einer Sekundärstruktur, bei der Bereiche der S/MARs mit der Kernmatrix interagieren und die dazwischenliegenden DNA-Bereiche als schleifenartige Strukturen herausragen. Diese Chromosomenschleifen erstrecken sich über 5 bis 200 kbp und es wurde entdeckt, dass aktiv transkribierte Gene in solchen Schleifen organisiert sind (Mirkovitch, Gasser, and Laemmli, 1987). S/MARs wurden häufig an den Grenzen von Transkriptionseinheiten, in DNase I hypersensitiven Bereichen gefunden (Bode et al., 2000a; Bode et al., 2000b). Diese Bereiche könnten als genomische Isolatoren dienen (Antes et al., 2001). Ebenso wurden S/MARs in direkter Nähe von Enhancern (Fernandez, Winkler, and Grosschedl, 2001) und den Ausgangspunkten der Replikation (Bode et al., 2000a; Bode et al., 2000b) detektiert. Dadurch stellen S/MARs Marker für unabhängig regulierte Genomeinheiten die sogenannten Chromatindomänen dar und sind Indikatoren für Bereiche mit regulatorischem Potenzial (Goetze et al., 2003).

Die Ziele der strukturellen und funktionellen Genomik sind klar: Die Bereitstellung eines funktionellen und strukturellen Modells, um Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, die für jedes Protein eines Organismus kodieren. Computergestützte Herangehensweisen werden eine wichtige Rolle spielen, um die enormen Mengen an Informationen zu handhaben. Dabei wird es nötig sein, mathematische Algorithmen zu entwickeln, welche für vollständige Genome anwendbar sind.

Es existieren zwei grundlegende Kategorien der Proteinstrukturvorhersage: Die vergleichende und die *ab initio* Vorhersage. Vergleichende Untersuchungen basieren auf der Verwendung von einer oder mehrerer evolutionär konservierter Proteinvorlagen. Der evolutionäre Verwandtschaftsgrad kann durch Sequenzähnlichkeiten der Proteine oder durch Vergleich mit Datenbanken von einzelnen Proteinstrukturdomänen ermittelt werden. *Ab initio* Vorhersage bedeutet eine ausschließlich von der genomischen Sequenz beginnende Modellierung. Die Voraussage von niedrigauflösenden Strukturen von Proteinen wird durch die Entwicklung allgemein anwendbarer Algorithmen *ab initio* möglich werden.

Auf der Basis dieser Strukturvorhersagen ergeben sich immer mehr Möglichkeiten, ein Protein mit einer bestimmten Funktion zu verbinden. Der heutige Stand erlaubt es diese Vorhersagen zusätzlich und als Vervollständigung experimenteller Daten einzusetzen. Da davon ausgegangen werden kann, dass Proteine in einer Zelle niemals isoliert tätig sind, muss es letztlich das Ziel sein die Funktion von Multiproteinkomplexen, Funktionskaskaden und ganzen Proteomen anhand der computergestützten Vorhersage von Struktur und Funktion der einzelnen Proteine aufzuklären.

1.8 Organisation von transkriptionell regulatorischen Bereichen: Promotoren

Polymerase II Promotoren sind durch Kombinationen mehrerer individueller regulatorischer Elemente charakterisiert. Die wichtigsten dieser Elemente sind die Transkriptionsfaktor (TF)-Bindungsstellen. Diese können in unterschiedlichster Art und Zusammensetzung in verschiedenen Promotoren vorkommen. Transkriptionsfaktoren können aktivierende oder hemmende Funktion in den spezifischen regulatorischen Bereichen haben. CAAT oder TATA Boxen sind weder nötig noch ausreichend für eine Promotoraktivität. Jeder individuelle Promotor besteht aus einem bestimmten Set dieser Bindungsstellen. Die Organisation von Promotoren kann in mindestens drei verschiedene Ebenen aufgeteilt werden. Die unterste Ebene besteht aus den Bindungsstellen für die individuellen Transkriptionsfaktoren, welche relativ kurze (15-20 nt), nur für die spezifische Erkennung ausreichende Sequenzen enthalten. Die nächste Ebene stellen die sogenannten Promotormodule dar, die aus zwei oder drei TF-Bindungsstellen in einem bestimmten Abstand zueinander bestehen. Die Kombination von Sequenzinformation, Distanz bestimmter Sequenzen, Anordnung und Orientierung dieser Sequenzen definiert einen Promotor (Werner, 1999). Die höchste Komplexität wird durch vollständige Promotor dargestellt, die alle funktionalen Elemente enthalten, welche zu einer Regulation der Transkription nötig sind. Dazu gehört ein relativ konservierter Kernpromotor bestehend aus TF-Bindungsstellen mit bestimmtem Abstand und Orientierung und aus zusätzlichen Elementen stromauf- oder stromabwärts. Die Funktionalität eines Promotors ist zudem noch von dem genomischen Kontext abhängig. Eine generelle Schwierigkeit besteht darin, dass sich zwar die Bestandteile, die Transkriptionsfaktorbindungsstellen durch Matrizen und mathematische Verfahren auf der DNA-Sequenz identifizieren lassen, dass aber das Zusammenspiel der Bestandteile nur kaum anhand der reinen DNA-Sequenz vorhersagen lässt.

Eine schematische Übersicht über den Aufbau eines Promotors gibt Abbildung 1.8.1.

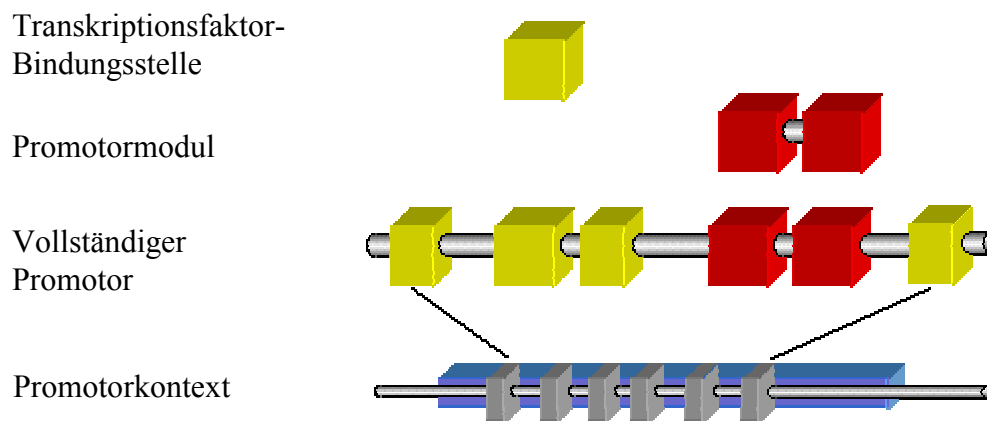


Abbildung 1.8.1: Schematische Übersicht des Aufbaus eines eukaryotischen Polymerase II-Promotors mit den unterschiedlich komplexen Ebenen der Organisation: TF-Bindungsstellen, Promotormodul, vollständiges Promotormodell und der Gesamtkontext.

Die Promotormodule basieren auf Ähnlichkeiten in den Bestandteilen (TF-Bindungsstellen) auf Sequenzebene, sowie deren relative Anordnung zueinander. Die *in silico* Analyse basiert auf einem Vergleich von Sequenzparametern mit speziell entwickelten Algorithmen anhand bekannter Trainingssequenzen (Werner, 1999). Dadurch ergeben sich Matrizen für die einzelnen Elemente. Vorhandene, zu untersuchende Sequenzen werden nun mit diesen Matrizen mathematisch auf Übereinstimmung verglichen. Dabei beschreiben die Werte „Core sim“ die Ähnlichkeit der untersuchten Sequenz in den vier konserviertesten Nukleotiden und „Mat sim“ die Ähnlichkeit der gesamten TF-Bindungsmatrix (Software: MatInspector). Ein Wert „1“ bedeutet jeweils identisch zu der rechnerisch aus bekannten Sequenzen ermittelten Matrize. Die Modelbewertung („Model Score“) summiert alle Werte der einzelnen Elemente. Die maximale Identität eines Modells mit den vorgegebenen Matrizen wird als 100 % gesetzt (Frech, Herrmann, and Werner, 1993).

Genexpression ist nicht erst seit der Entschlüsselung weiter Teile verschiedener eukaryotischer Genome im Fokus der wissenschaftlichen Analyse. Obwohl die Menge an experimentell ermittelten Daten stetig ansteigt, kann die Annotation von transkriptionell aktiven Sequenzen nicht mit dem exponentiellen Wachstum der Sequenzinformationen Schritt halten. Im Allgemeinen ist die Information über die funktionale Organisation einer regulatorischen Sequenz eines Genes nur in Fragmenten bekannt. Zum einen müssen nicht alle Transkriptionsfaktorbindungsstellen experimentell verifiziert sein, zum anderen können weiter entfernte Sequenzbereiche, die nicht direkt mit dem Gen des Interesses

in Verbindung gebracht werden, z.B. als Enhancer einen direkten Einfluss auf die Expression haben. Experimentell können TF-Bindungsstellen durch gezielte Mutagenese, Deletionsanalysen, DNase I Footprinting oder Ko- und Überexpressionsversuche ermittelt werden.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften von Risp, aber vor allem des KIAA0592-Proteins näher zu charakterisieren. Dabei galt das Interesse besonders der Untersuchung der Interaktion des Risp-Fragments mit Rev in menschlichen Zellen, aber auch der Identifizierung und Charakterisierung des vollständigen KIAA0592-Klons.

Vor allem die Entschlüsselung der noch unbekannten zellulären Regulation und Funktion dieses großen unbekannten Proteins ist von Interesse.

Jeder Interaktionspartner von Rev ist unter dem Gesichtspunkt der Möglichkeit eines Eingreifens in die Rev-Funktion durch Veränderung dieser Interaktion von großem medizinischen Interesse.

Unabhängig davon waren die Eigenschaften des KIAA0592-Gens bzw. des dazugehörenden Proteins zu Beginn dieser Arbeit weitestgehend unbekannt. Im Allgemeinen sind nur wenige Proteine der Größe von KIAA0592 in der Literatur beschrieben.

Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit

1. die Anordnung und Organisation des KIAA0592-Gens,
2. die biochemischen und strukturellen Eigenschaften des KIAA0592-Proteins,
3. erstmals die Expression des KIAA0592-Proteins,
4. die Interaktion von Risp mit Rev und Crm1 in Säugerzellen,
5. die Lokalisationseigenschaften von Risp und deren Einfluss auf Rev und
6. die Lokalisationssignale von Risp

untersucht bzw. gezeigt werden.

2 Material

2.1 Verwendete Abkürzungen und Worterklärungen

³² P	radioaktiver α - ³² Phosphatrest
A	Adenosin
AB	Antibiotikum, antibiotisch
Abb.	Abbildung
Ac	Acetatrest einer Verbindung
A.d.	Aqua destillata (doppelt-deionisiertes Wasser, Millipore, Eschborn)
ad	Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen
AM	Antimykotikum, antimykotisch
AmS	Ammoniumsulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Tatusova and Madden, 1999)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
CIP	alkalische Phosphatase („calf intestine phosphatase“)
cDNA	komplementäre DNA (hergestellt durch reverse Transkription an einem mRNA Matrizenstrang)
CM	Hefe-Minimalmedium („complete minimal“)
Contig	Set überlappender Klone oder Sequenzen, aus dem eine genomische Gesamtsequenz erstellt werden kann (NCBI)
cpm	Maß der Radioaktivität von radioaktiven Strahlern („counts per minute“), durch einen Szintillationszähler gemessen
CTP	Cytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natrium-Desoxycholat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (N steht für eine der vier Basen)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
Gal	Galactose
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
Glc	Glucose (= Dextrose)

GTP	Guanosintriphosphat
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
I	Intensität
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare
kD, kDa	Kilodalton
LB	Bakterienmedium nach Luria-Bertani
LMB	Leptomycin B
LTR	Long Terminal Repeat
Lsg.	Lösung
MCS	Multiple Klonierungssequenz ("multiple cloning site")
min	Minute
mRNA	Boten- ("messenger") Ribonukleinsäure
ME	Median
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NC	Nitrozellulose
NES	Kernexportsignal ("nuclear export signal")
NLS	Kernlokalisierungssignal ("nuclear localisation signal")
NOS	Nukleoläres Lokalisierungssignal
nr	Sammlung von Proteindatenbanken (NCBI)
ORF	Offener Leserahmen ("open reading frame")
OD	optische Dichte einer Flüssigkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
pDNA	Plasmid DNA
p	p-Wert der statistischen Signifikanz/Wahrscheinlichkeit versch. Tests
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
P./S.	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Pr	Protein
Raff	Raffinose
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	rev response element
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTase	reverse Transkriptase
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (www.rzpd.de)
s.	siehe
SAP	alkalische Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodiumdodecylsulfate“)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts („standard error mean“)
SOC	Bakterienvollmedium
SSC	Natriumcitrat-Salzlösung („Saline-sodium citrate“)
T	Thymidin

Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
T _m	Schmelzpunkt
Tris	Trishydroxyaminomethan
TSS	Transkriptionsstart („Transcription start site“)
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Units (Enzymeinheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/n	über Nacht
vol	Volumenanteil
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YNB	Stickstoffbasis für Hefemedien („Yeast Nitrogen Base“)
YPD	Hefemedium mit Pepton und Dextrose

Gene werden kursiv in Kleinbuchstaben geschrieben (z.B. *rev*), ihre Proteinprodukte mit einem Großbuchstaben am Anfang (z.B. Rev). SI-Einheiten sind nicht aufgeführt.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

1-kb DNA-Längenstandard	Life Technologies, Eggenstein
2log DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Schwalbach
α- ³² P-dCTP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Acrylamid	Bio Rad, München
Agarose (Seakem)	FMC Bio Products, Rockland, USA
Agar	Life Technologies, Eggenstein
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Amplitaq [®] DNA Polymerase	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
Amplitaq Gold [™]	Applied Biosystems, Weiterstadt
AMV Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics, Mannheim, Life Technologies, Eggenstein, oder Promega, Madison, USA
Antibiotische-Antimykotische Lsg. (AB/AM)	Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
CIP	New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNA Polymerase II (Klenow Large Fragment)	New England Biolabs, Schwalbach
dNTPs	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
EDTA	Sigma, Deisenhofen

Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Filter 0.22µm	Nalgene, USA
Filterpapier, Whatman 3mm	Whatman, Maidstone, GB
FKS	Gibco, Karlsruhe
	Seromed, Berlin
Formamid	Merck, Darmstadt
FuGENE™6	Roche Diagnostics, Mannheim
Full Range Recombinant	Amersham Biosciences, Freiburg
Rainbow Molecular Weight Markers	
Glasbodenschälchen für Zellkultur	MatTek Corporation, Ashland, USA
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Molecular Probes, Oregon, USA
IPTG	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaleidoscope Prestained Standards	Biorad, München
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
LMB	Sigma, Deisenhofen
Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
MMLV H ⁻ Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
NitrozelluloseBA85	Schleicher und Schuell, Dassel
Nonidet NP-40®	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol 1000	Baker, USA
Penicillin/Streptomycin -Lsg.(P./S.)	Life Technologies, Eggenstein
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Applied Biosystems, Weiterstadt
10x Phosphorylierungspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, BD Falcon, Düren oder Nunc, Wiesbaden
	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
	Promega, Madison, USA
RNA-Längenstandard	Promega, Madison, USA
RNasin, RNase-Inhibitor	Ambion, Austin, USA
Rnase Zap®	Teltest, Friendswood, USA
RNAzol™ B	Merck, Darmstadt
SDS (Pulver)	Ambion, Austin, USA
SDS, 20 % Stocksolution, RNA-Reinheit	Life Technologies, Eggenstein
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
	Löwe Biochemika, München
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton® X-100	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma, Deisenhofen
Tween® 20	Difco Laboratories, Sparks , USA
Stickstoffbasis für Hefe ohne Aminosäuren, ohne Ammoniumsulfat (YNB-AS/AmS)	
Zählkammer MD Kova Raster 10	Madaus Diagnostik, München
Zetaprobe® GT Nylonmembran	Bio Rad, München

Oligonukleotide für DNA-Amplifikationen (PCR) und Sequenzanalysen wurden in der

AG BIODV von Herrn Utz Linzner in der GSF, Neuherberg synthetisiert. Weitere Gebrauchswaren und Laborartikel wurden von den Firmen Abimed (Langenfeld), Amersham (Braunschweig), Beckman (München), Greiner Bio-one (Frickenhäusen), Nunc (Wiesbaden), BD Falcon (Düren), Costar (Cambridge, USA), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Den Haag, Niederlande), Kremer & Kreiler (München), Eastman Kodak (Rochester, USA) und Agfa Gevaert (Belgien) bezogen.

2.2.2 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Zellkultur wurden autoklaviert. Die hier nicht aufgeführten speziellen Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methodenabschnitten beschrieben. Falls nicht anders beschrieben sind die Lösungen mit sterilem Aqua destillata (A.d.) hergestellt.

2.2.2.1 Pufferlösungen

Puffer

Ammoniumpersulfatlösung

Aufschlusspuffer für Protein-Extraktion aus Zellen (1x RIPA)

Aufschlusspuffer für DNA-Extraktionen aus Zellen

Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE (10x)

Ethidiumbromidlösung

Chemikalienbestandteile

Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v)

Tris, pH 7.4; 50 mM
NaCl 150 mM
Triton X-100 1 %
Na-Desoxycholate (DOC; 1 %)
SDS 0.1 %

Tris/HCl pH8.0; 10 mM
NaCl 100 mM
EDTA pH8.0; 25 mM
SDS 0.5 %

Tris Base 250 mM
Glycin 1.92 M
SDS 1 % (w/v)

Ethidiumbromid 1 % (w/v)

Gelauftragspuffer für SDS-PAGE (5x)	Tris pH 6.8; 250 mM SDS 10 % β-Mercaptoethanol 12.5 % Bromphenolblau 0.1 %
IPTG-Lösung	IPTG 0.2 % steril filtriert
Kochsalzlösung, physiologisch 0.9 %	NaCl 154 mM
Lithiumacetat-Puffer (LiAc)	1 ml 10x TE-Puffer, pH 7.5 1 ml 10x LiAc-Stocklösung add 10 ml
Lithiumacetat-PEG-Puffer	1 ml 10x TE-Puffer, pH 7.5 1 ml 10x LiAc-Stocklösung 8 ml 50 % PEG6000.
LiAc-Stocklösung (10x) pH 7,5	Lithiumacetat 1 M pH einstellen mit Essigsäure
Phosphat gepufferte Kochsalzlg pH7.4 (PBS)	NaCl 140 mM KCl 5.4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 9.7 mM KH ₂ PO ₄ 2 mM
Probenauftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	Bromphenolblau 0.25 % Xylencyanol FF 0.25 % Ficoll 15 %
SDS-Lösung (10 %)	Natriumdodecylsulfat 10 % (w/v)
TBS-N-Puffer pH7.6	Tris Base 20 mM NaCl 137 mM HCl 1N NP-40 0.1 %
TE-Puffer (1x)	Tris/HCl 10mM EDTA 1mM
Tris-Acetate-EDTA-Puffer (50x) (TAE)	Tris Acetat 2M Essigsäure 5,71 % EDTA pH 8.0
Tris/HCl, 1M (verschiedene pH-Werte)	Tris Base 1M pH mit konzentrierter HCl nachstellen,

Transfektionspuffer (Pharmacia):	<i>Puffer A:</i> CaCl ₂ 0,5 M in HEPES-Puffer 0,1 M (pH 7.0) <i>Puffer B:</i> NaCl 0,28 M, NaH ₂ PO ₄ 0,75 mM, Na ₂ HPO ₄ 0,75 mM in HEPES-Puffer 0,05 M (pH 7.0)
Transferpuffer:	Tris 25 mM, pH 8.3 oder 10.5; Methanol 20 %, Glycin 1.44 %
Trypsin-EDTA Lösung	NaCl 140 mM KCl 5.4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 100 mM KH ₂ PO ₄ 2.2 mM Trypsin 0.05 % EDTA 0.54 % steril filtriert
Waschpuffer für Immunoblot (PBS-T)	Tween [®] 20 0.1 % in PBS
X-Gal Lösung	X-Gal 2 % in N,N-dimethylformamid 100 % Lichtgeschütz

2.2.2.2 Proteaseinhibitoren

Inhibitor:	Spezifität:	Stocklösung:	Verdünnung im Lysepuffer: (1x RIPA)
Antipain	trypsinähnliche Ser/Cys-Proteasen	5mg/ml in DMSO	1:1000
Chymostatin	chymotrypsinähnliche Ser/Cys-Proteasen	5mg/ml in DMSO	1:1000
Leupeptin	trypsinähnliche Ser/Tyr-Proteasen	5mg/ml in DMSO	1:1000
Pepstatin A	Asp-Proteasen	5mg/ml in DMSO	1:1000
PMSF	Serin Proteasen	15,5mg/ml in 2-Propanol	1:500

Tabelle 2.2.1: Liste der zur Herstellung von Proteinlysaten verwendeten Proteaseinhibitoren mit ihren Wirkungsbereichen (inhibierten Proteasen), Konzentration der verwendeten Stocklösungen und verwendete Verdünnung der Stocklösungen.

2.2.3 Verwendete Kits

Name:

2-in-1 Nucleospin Kit
Cellpfect Transfection Kit
Checkmate Mammalian Two-Hybrid
BCA Protein Assay Reagent Kit
DNeasy Kit
Expand® HighFidelity PCR Kit
Gel Purification Kit
Nucleobond AX500/100 Kit
PCR Purification Kit
PCR-Script™ Amp Cloning Kit
Plasmid Maxi/Midi/Mini Kit
Rapid DNA Ligation Kit
Riboprobe™ System T7
RNeasy Kit
TOPO TA Cloning Kit

Hersteller :

Macherey-Nagel GmbH, Düren
Pharmacia Biotech, Freiburg
Promega, Madison, USA
Pierce, Rockford, USA
Qiagen, Hilden
Roche Diagnostics, Mannheim
Qiagen, Hilden
Macherey-Nagel GmbH, Düren
Qiagen, Hilden
Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Qiagen, Hilden
Roche Diagnostics, Mannheim
Promega, Madison, USA
Qiagen, Hilden
Invitrogen, Karlsruhe

2.2.4 Bakterienmedien

LB-Medium (nach Luria-Bertani)

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1000 ml mit AD, pH 7,0

Einfriermedium für Bakterien

2 Teile 80 % Glycerol
1 Teil 10 mM MgCl₂

SOC-Vollmedium ohne Selektion
(Life Technologies, Invitrogen)

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
2,5 mM KCl
20 mM Glucose
ad 1000 ml mit AD, pH 7,0

2.2.5 Hefemedien

Inhaltsstoffe wurden in A.d. vollständig gelöst und autoklaviert. Aminosäuren wurden als Stocklösungen in A.d. für die jeweiligen Selektionsmedien („Drop out“) oder Platten hergestellt, durch einen 0,22 µm Membranfilter sterilisiert und bei 4°C gelagert. Von diesen Stocklösungen wurden steril 8,3 ml (*16.6 ml/Liter) zu dem autoklavierten CM-Medium hinzugegeben.

2.2.5.1 Aminosäurelösungen

<u>Aminosäure:</u>	<u>Endkonzentration (mg/ml)</u>	<u>Stock (mg/100 ml)</u>
L-Arginin (HCl)	20	240 (4°C)
L-Asparaginsäure	100	1200 (RT)
L-Glutaminsäure	100	1200 (RT)
L-Histidin	20	240 (4°C)
L-Leucin	60	720 (RT)
L-Lysin (mono-HCl)	30	360 (4°C)
L-Methionin	20	240 (4°C)
L-Phenylalanin	50	600 (RT)
L-Serin	375	4500 (4°C)
L-Threonin	200	2400 (4°C)
L-Tryptophan	40	480 (4°C)
L-Tyrosin *	30	180 (RT)
L-Valin	150	1800 (4°C)
Uracil	20	240 (RT)

CM Medium:

- YNB-AS/AmS 0.17 %
- (NH₄)₂S₀ 0.5 %

Gal/Raff/CM Medium:

- YNB-AS/AmS 0.17 %
- (NH₄)₂S₀ 0.5 %
- Galactose 2 % + Raffinose 1 % + NaOH 0.01 %

Glc/CM Medium:

- Aminosäurelösungen
- YNB-AS/AmS 0.17 %
- (NH₄)₂S₀ 0.5 %
- Dextrose 2 % + NaOH 0.01 %
- Aminosäurelösungen

Glc/CM X-gal Medium:

- YNB-AS/AmS 0.17 %
- (NH₄)₂S₀ 0.5 %
- Dextrose 2 % + NaOH 0.01 %
- Aminosäurelösungen
- KH₂P₀ 0.07M pH 7.0
- X-gal 0.004 %

Gal/Raff/CM Medium:

- YNB-AS/AmS 0.17 %
- (NH₄)₂S₀ 0.5 %
- Galactose 2 % + Raffinose 1 % + NaOH 0.01 %
- Aminosäurelösungen
- KH₂P₀ 0.07M pH 7.0
- X-gal 0.004 %

YPD Medium:

- Yeast extract 1 %
- Pepton 2 % + Dextrose 2 % + NaOH 0.01 %

Alle Medien wurden autoklaviert. Aminosäurelösungen wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben. Für Kulturplatten der jeweiligen Medien wurde vor dem Autoklavieren 2 % Bacto-Agar zugegeben und danach das Medium in 100mm Platten gegossen.

2.2.6 Zellkulturmedien

- RPMI1640 mit NaHCO_3 ,
- DMEM mit Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4.5 g/l Glucose,
- DMEM mit Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4.5 g/l Glucose ohne Phenolrot

Die Medien waren von Life Technologies, Eggenstein. Vor Gebrauch wurde 10 % bei 56°C hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum sowie bei Bedarf 1 % AB/AM-Lösung zugegeben. Dies entspricht 100 Einheiten Penicillin, 100 µg Streptomycin, und 0.25 µg Fungizone[®]/ml.

2.2.6.1 Einfriermedium

- DMEM mit Glutamax I, ohne Na-Pyruvat, 4.5 g/l Glucose,
+ 20 % FKS + 10 % DMSO + 1 % AB/AM

2.3 Antikörper

2.3.1 Antikörper gegen zelluläre Antigene

- Monoklonale Ratte anti-Risp 5D3-13211 (IgG2a) und 8A11-1-1 (IgG1) Antikörper (Dr. Elisabeth Kremmer, GSF, München)
- Monoklonaler Maus anti-GAPDH Antikörper (Chemicon, Hofheim)

2.3.2 Antikörper gegen HIV-1 Proteine

- Monoklonaler Maus anti-Rev Antikörper 8E7 (Kalland et al., 1994)
- Monoklonaler Ratte anti-Rev Antikörper (# 5C6-1-1)
(Dr. Elisabeth Kremmer, GSF, München)

2.3.3 Sonstige primäre Antikörper

- Monoklonaler Maus anti-GFP Antikörper, Living Colors A.v.(BD Clontech, Düren)
- Monoklonaler Maus anti-GFP Antikörper (Chemicon, Hofheim)

2.3.4 Sekundäre Antikörper

- FITC-konjugierter Schaf anti-Ratte Antikörper, polyklonal (Dianova)
- Cy3-konjugierter Ziege anti-Ratte Antikörper, polyklonal (Dianova)
- Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper
- Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Ratte Antikörper

2.4 Als Primer verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Tm	Sequenz (5'-3')
26523	BamHI-AUG-pcRev	81	ATATGGGATCCCCGCTGGCATGGCAGG AAGAAGCGGA
26524	Risp-BamHI-Met	79	ATATGGGATCCCCGCTGGCATGTTTCC TGCTCTAGGCGAG
26525	Risp-EcoRI-Stop	71,3	TATATGAATTCCCTACTGGCCTCCAA AGGCATTCAG
29208	RTPCR-Nagase1	47,8	GAAGCAATTAAACCCTCTCAG
29209	RTPCR-Nagase2	44,2	GATACCAGAGGAGAAGATGTC
29210	RTPCR3	55,6	CTGACCTTTTTGATTCTGGGGAC
2921	RTPCR4	55,4	TTTGGTTGTCTTAGCCTGGATACC
29212	RTPCR1	55,5	CCAAAGCCACAGATTGTGCGC
29213	RTPCR2	56,8	CCTCCTTCTCAGAGTCAGCAAAAAG
29764	KIAAseq1	48,1	TTTGGTTGTCTTAGCCTGGATACC
29765	KIAAseq2	48,6	GTCAGATGAAGATTTTGCC

29766	KIAAseq3	47,3	CTTCATCATCCAAACCTGG
29767	KIAAseq4	47,3	TCTTTTTGGGGTACAGC
29768	KIAAseq5	47,4	GGATAAGAAGGTTGAGAGTGC
29769	KIAAseq6	54,3	TTTCAGCTCTGCCAAGTCCC
29770	KIAAseq7	50	TCAAGATGAGAGGGAAGCG
29771	KIAAseq8	49	AGCAGAGAATCCTGCCAAC
29772	KIAAseq9	49	CCAACATCTTTGATGATCCC
29773	KIAAseq10	47,2	ATATGGATGGGAACCCTAAC
29237	BamHI-Risp-forward	85,4	GACGCGTGGATCCGTCTGTTTCCTGCT CTAGGCGAGGCCAGCAGTG
29238	Risp-BamHI-reverse	72,2	TCTAGAGGATCCCCTACTGGCCTCCAA AGGCATTC
29239	BamHI-Rev-forward	86,4	GACGCGTGGATCCGTCTGGCAGGAAG AAGCGGAGACAGCGACGAAG
29240	Rev-BamHI-reverse	69,1	TCTAGAGGATCCCTCAATTCTCTTTAGT TCCTGACTCGAG
29890	Sall-pBsRev-forward	85,7	CGTCGACTTTGGATCCGTCTGGCAGGA AGAAGCGGAGACAGCGACGAAG
29891	Sall-pBSRev-reverse	72,3	TAAGTCGACGCCCTCAATTCTCTTTAGT TCCTGACTCGAG
32296	CRM1-BamHI	63	CCGTAGAACTAGTGGATCCTTAATCAC ACATTTC
32297	BamHI-CRM1	71,7	CCGGGGATCCGTCCAGCAATTATGACA ATGTTA
33318	60+KIAA/BamHI/TAG/3' short	73,7	TCTAGAGGATCCCCTACTGGCCTCCAA AGGCATTCAG
33320	60+KIAA/NheI/ATG/5' long	99,4	GCTAGCTGGATCCGTATGGCAGGTCGG ATCACGTGCGGTTCTGTCACGTGACA TCAGGTCACGTGAGGCCGCTACGCCC CGGGCAGCTTGG
33321	60+KIAA/NheI/3' short	75,9	CTAGCTAGCGAGGATCCCCTGGCCTCC AAAGGCATT
35506	pRisp-950(NotI)for	80,4	ATGCGGCCGCTCTCCAATGTAGTGGAG ACCCTTCCGC
35507	pRisp-2650(NotI)for	81,8	ATGCGGCCGCGCCTGTAATTGGAGAA CTTTGGGAGGG
35508	pRisp-1(NotI)rev	86,0	ATGCGGCCGCGCTGAGGGGAGGAAGC TGCGGAAGTGG
35511	pERV3-(NotI)for	71,8	ATGCGGCCGCTATATGAGGCAGGAAAT ATAAAAGGAA
35512	pERV3-(NotI)rev	78,0	ATGCGGCCGCGCTGGCTACCAAAATG TTG
42907	5-XhoI-pCMV	73	GTCGACCCTCGAGGTCAATATTGGCCA TTAGCCAT
43364	3-BamHI-pCMV/Intron	63,5	GATATCGGATCCTAATTGAACTGGGAG TGG
42909	5-XhoI-p950Risp	78,7	GTCGACCCTCGAGGGGCGCTCTCCAA TGTAAGTGG
42910	3-BamHI-p950Risp	79,2	GATATCGGATCCGGCCGCGCTGAGGGG AGGAAG
43117	5primepBIND-BamHI-AA2	70	CCGGAATTCCCGGGGATCCGTCTG

43794	SV40polyA-rev-Afl III	64,5	TTGCTCACATGTTTACCACATTTGTAGA GGTTTAC
43795	SV40polyA-for	63	ATCCGTCGACTTGACGCGTTGATATC
44206	CMVKIAAvector-5p-1	58,3	ATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATT GC
44207	CMVKIAAvector-5p-2	58,4	TGTCCACTCCCAGTTCAATTAGGATC
24452	PBGD mRNA A (=antisense)		GAATGTTACGAGCAGTGATGCCTAC
24449	PBGD mRNA S (=sense)		GATTGGAGAGAACCTGTTTACC

Tabelle 2.4.1: Liste der als PCR-Primer verwendeten Oligonukleotiden. Fortlaufende Synthesenummer der GSF, Name, Schmelzpunkt (T_m) und Oligosequenz.

2.5 Plasmide

2.5.1 KIAA0592-Plasmide

- pBluescriptII SK+ KIAA0592

Plasmid mit der cDNA (AB011164.1) des KIAA0592-Gens. Das Plasmid enthält zusätzliche DNA-Bereiche zur Sequenzierung und ein Ampicillin-Resistenzgen (erhalten von Kazusa DNA Research Institute, DNA Technology; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan).

- pPCR-60KIAA0592

PCR-Klonierungsvektor. Die cDNA-Sequenz des KIAA0592-Proteins wurde mittels PCR (Primer 33320 und 33321) von dem Vektor pBluescriptII-Sk+KIAA0592 amplifiziert. Dabei wurden am 5'Ende durch den Primer 33320 60 Nukleotide angefügt, welche der genomischen Sequenz 60bp stromaufwärts des ersten publizierten KIAA0592-Exons entsprechen. Das erhaltene Fragment wurde „blunt end“ in die vorhandene SrfI-Restriktionsschnittstelle inseriert. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz. Die Sequenz entspricht in vier Codons nicht der publizierten cDNA. Im einzigen Klon #1.4 wurden die Codons für die folgenden Aminosäuren $S_{450} \rightarrow F$, $T_{468} \rightarrow A$, $T_{1169} \rightarrow A$, $S_{1263} \rightarrow G$ bei der PCR Amplifikation ausgetauscht. Die so verlängerte Sequenz wird im Folgenden 60KIAA0592 und das dadurch kodierte Protein KIAA0592komplett genannt.

- pCMV-60KIAA0592

KIAA0592 Expressionsplasmid. Der CMV-Promotor inklusive des chimären Introns wurde mittels PCR (Primer 42909 und 43364) von dem pBIND-Plasmid amplifiziert. Durch zusätzliche Sequenzen an den beiden Primern wurden BamHI- und XhoI-Schnittstellen an das

Fragment hinzugefügt. Mit diesen Schnittstellen wurde das PCR-Fragment dann vor den Leserahmen des KIAA0592 in den pPCR Script™ Amp SK+ Vektor kloniert.

- pCMV-60KIAA0592pA

KIAA0592-Expressionsplasmid. Das SV40-Polyadenylierungssignal des pBIND-Vektors wurde mittels PCR (Primer 43794 und 43795) amplifiziert. Durch eine amplifizierte NotI-Sequenz und eine zusätzliche Sequenz am 3' Primer, welche eine AflIII-Schnittstelle hinzufügt wurde das Fragment in den pCMV-60KIAA Vektor anschließend an den ORF von KIAA0592 kloniert.

- hGfa-60KIAA0592

Ein 2,2 kbp großes Fragment, welches den humanen Promotor des „Glial Fibrillary Acidic Proteins“ (GFAP) enthält, wurde aus dem Plasmid hGfa-2 lacZ (Brenner et al., 1994; Radany et al., 1992) ausgeschnitten und in die MCS des pEGFP-1 Plasmids (Clontech) inseriert. EGFP wurde durch die cDNA von KIAA0592komplett ersetzt.

2.5.2 Risp-Expressionsplasmide

- pFRED-Risp (=pcRisp16.4.1c sg143)

Expressionsplasmid des RispGFP Fusionsproteins. Es wurde das *risp* enthaltene Fragment des cDNA-Klons 16.4.1 aus der cDNA-Bank menschlicher Jurkat T-Zellen als Fusionsprotein in pFRED kloniert (Francesca Ceccherini-Silberstein, GSF, Neuherberg). Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

- pFRED-Rev1-54Risp

Plasmid, welches ein Fusionsprotein aus den ersten 52 Aminosäuren von Rev zusammen mit Risp und GFP unter der Kontrolle des CMV Promotors exprimiert. Hierzu wurde der ORF für Rev1-54Risp bis zu dem Codon der Aminosäure 164 von GFP mittels SacII und HpaI aus dem Vektor pFRED-Rev1-54Risp4GFP herausgeschnitten und anstatt des ORF für RevM10bIGFP(1-164), geschnitten mit den gleichen Enzymen, in den Vektor pBsRevM10blsg143 eingesetzt.

- pFRED-Rev1-54Risp4GFP

Plasmid, welches ein Fusionsprotein aus den ersten 52 Aminosäuren von Rev zusammen mit Risp und vier hintereinander folgenden GFP-Sequenzen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Eine Sequenz, entsprechend dem *risp*-ORF, wurde dafür aus dem pFRED-Risp-Plasmid ausgeschnitten und in eine einzelne NheI-Restriktionsschnittstelle vor die GFP-Sequenzen des Vektors pFRED-Rev1-54 4GFP ligiert.

- pcIg-Risp:

Plasmid basierend auf dem pcIg-Vektor (Dr. W. Kolanus, Genzentrum München), welches ein Fusionskonstrukt aus Risp und den CH2- und CH3-Domänen der schweren Kette des humanen IgG1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (Ceccherini-Silberstein, 2001). Der *risp*-ORF beginnt mit dem zweiten Codon.

- pcDNA3-Risp (sense und antisense)

Risp Expressionsplasmid. Die *risp*-DNA wurde mittels PCR aus pcRisp-sg143 amplifiziert und isoliert. Dabei wurden an beiden Enden EcoRI-Schnittstellen hinzugeführt. Das *risp*-Fragment wurde in die MCS von pcDNA3 kloniert. Das *risp*-Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert. Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

- pcDNA3-DKFZ (sense und antisense)

DKFZ434O171-Expressionsplasmid. Die DKFZ-DNA wurde mittels PCR aus pSPORT-DKFZ434O171 amplifiziert und isoliert. Dabei wurden an beiden Enden EcoRI-Schnittstellen hinzugeführt. Das DKFZ-Fragment wurde in die MCS von pcDNA3 kloniert. Das Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert. Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

- pSPORT-DKFZ434O171

DKFZp434O171 cDNA Klon mit hoher Identität zu *risp*, inseriert in dem pSPORT Vektor bezogen vom RZPD, Berlin durch Dr. J Adamski, ISG, GSF Neuherberg.

2.5.3 Hefe 2-Hybridsystem

- pEG202-LexA

Hefe- und E. coli-Multikopienvektor, welcher den 2µm Hefe-Replikationsursprung (*ori*) und einen HIS3-Selektionsmarker trägt. Das Plasmid kodiert für die gesamte kodierende Sequenz des bakteriellen DNA-Bindungsproteins LexA unter der Kontrolle des Hefe-Alkoholdehydrogenase1 (*ADH1*) Promotors und Terminators. Der Vektor enthält eine MCS zur Insertion des Hefe 2-Hybrid „Köderproteins“, eine Ampicillin-Resistenz und einen bakteriellen Replikationsursprung (*ori*).

- pEG202-sRev (sense)

Der HXB2-*rev*-ORF, beginnend mit dem zweiten Codon des pBsRev, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Restriktionsstelle inseriert.

Die *rev*-Sequenz liegt auch in Gegenstrangorientierung (antisense) vor (Dr. A. Ludvigsen, GSF, Neuherberg).

- pEG202-cRev (sense)

Der HXB3-*rev*-ORF, beginnend mit dem zweiten Codon des pcRev, wurde mittels PCR (Primer: 19777 und 19776) amplifiziert und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Restriktionsstelle inseriert (Ceccherini-Silberstein, 2001).

- pEG202-RevM4 (sense)

Hefe-Expressionsplasmid, welches die M4-Mutation in der Multimerisierungsdomäne I von Rev (AS: 23-25-26 YSN—> DDL, (Malim et al., 1989)) als Fusionsprotein mit LexA exprimiert. Der *revM4*-ORF, beginnend am zweiten Codon des pcTat-RevM4 ((Thomas et al., 1998), erhalten von Dr. J. Hauber, Universität Erlangen), wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: 19777 und 19776) und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Restriktionsstelle inseriert. Die *rev*-Sequenz liegt auch in Gegenstrangorientierung (antisense) vor (Ceccherini-Silberstein, 2001).

- pEG202-RevM5 (sense)

Hefe-Expressionsplasmid, welches die M5 Mutation in der NLS/RNA-Bindungsdomäne von Rev (Malim et al., 1989) als Fusionsprotein mit LexA exprimiert. Der *revM5*-ORF, beginnend am zweiten Codon des pcRevM5, wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: 19777 und 19776) und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Restriktionsstelle inseriert (Ceccherini-Silberstein, 2001).

- pEG202-RevSLT40 (sense)

Hefe-Expressionsplasmid, welches die Mutation SLT40 in der Multimerisierungsdomäne II von Rev (AS: 59-60 IL—> DD, (Thomas et al., 1998)) als Fusionsprotein mit LexA exprimiert. Der *revSLT40*-ORF, beginnend am zweiten Codon des pcRevSLT40, wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: 19777 und 19776) und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Restriktionsstelle inseriert (Ceccherini-Silberstein, 2001).

- pEG202-RevM10BL (sense und antisense)

Hefe-Expressionsplasmid, welches die Mutation M10BL (Malim et al., 1989) in der NES-Domäne von Rev als Fusionsprotein mit LexA exprimiert. Der *revM10BL*-ORF, beginnend am zweiten Codon des pCsRevM10BL-sg143, wurde PCR amplifiziert (Primer: 19777 und 21116) und in den Leserahmen des *lexA*-Gens in eine EcoRI-Schnittstelle inseriert (in sense und antisense Orientierung).

- pJG4-6

Der Vektor ist ein Derivat des pJG4-5-Vektors, bei dem eine NotI-Schnittstelle entfernt wurde und zwischen die vorhandenen EcoRI und XhoI eine Sequenz mit MluI und NotI eingefügt wurde. Der Vektor kodiert für die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors B42 und erlaubt eine Expression von Fusionsproteinen durch Klonierung in die hinzugefügten Schnittstellen am N-terminalen Ende von B42 (Dr. W Kolanus, Genzentrum, München).

- pJG4-6-Risp

pJG4-6-Vektor, der Risp als Fusionsprotein mit der B42-Transkriptionsaktivierungsdomäne exprimiert. Der *risp*-Leserahmen, beginnend bei dem zweiten Codon von pcRisp-sg143, wurde mittels PCR (Primer 18733 und 18510) amplifiziert und in die MluI/NotI-Restriktionsschnittstellen des pJG4-6-Vektors inseriert (Ceccherini-Silberstein, 2001).

- pB42AD-sRev

Der HXB2-*srev*-ORF, beginnend mit dem zweiten Codon des pBsRev, wurde mittels PCR (Primer: 8726 und 9585) amplifiziert und in den Leserahmen der B42-Transkriptionsaktivierungsdomäne in eine EcoRI-Restriktionsstelle des pB42AD Vektors (Clontech) inseriert (Ceccherini-Silberstein, 2001).

2.5.4 Säuger 2-Hybridsystem

- pACT:

Expression der VP16-Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 411-456) des Herpes simplex Virus unter der Kontrolle eines CMV-Promoters. Die VP16-Domäne ist mit einer NLS (nukleäre Lokalisierungssequenz) ausgestattet. Auf der 5'-Seite des Gens befindet sich ein chimäres Intron. In 3'-Richtung schließt eine MCS an das Gen an und wird gefolgt durch eine SV40-Polyadenylierungssequenz. Das Intron bewirkt eine Interaktion mit dem zellulären Spleißapparat, welcher an den RNA Exportmechanismus gekoppelt ist. Dies bewirkt in Zusammenhang mit dem CMV-Promotor und dem SV40-Polyadenylierungssignal eine verstärkte Proteinexpression.

Zusätzlich ist das Gen durch die RNA-Polymerase-Promotoren T7 und T3 flankiert, die zur *in vitro* Transkription und in einer Sequenzierungsreaktion als Primer dienen können. Außerdem besitzt das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz und eine Neomycin-Resistenz (Promega, Madison, USA).

- pBIND:

Expression der DNA-Bindungsdomäne Gal4 (Aminosäuren 1-147) der Hefe unter dem CMV-Promotor. Wie der pACT-Vektor ist die Sequenz der DNA-Bindungsdomäne von einem chimären Intron, einer MCS, dem SV40-Polyadenylierungssignal und den T7- und T3-Promotoren flankiert. Die Renilla Luciferase wird stromabwärts, durch einen eigenen SV40-Promotor und Enhancer reguliert, konstitutiv exprimiert. Außerdem besitzt das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz (Promega, Madison, USA).

- pG5luc:

Reportervektor, der für die „Firefly“ Luciferase (Luc) kodiert. Auf DNA-Ebene sind fünf Gal4-Bindungsmotive vor einer Minimalpromotorsequenz des „major late“ Promotors des Adenovirus vorgeschaltet. 3' des *luc*-Gens befindet sich ein Polyadenylierungssignal. Desweiteren besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz (Promega, Madison, USA).

- pACT-MyoD:

Kontrollvektor, der das VP16-MyoD-Fusionsprotein gesteuert durch einen CMV-Promotor exprimiert. Das Segment einer murinen *myoD*-DNA kodiert für die Aminosäuren 1-318 des Gesamtproteins. Das *myoD*-Gen ist in die MCS des pACT-Vektors im Leserahmen von VP16 kloniert. MyoD ist ein im Skelettmuskel exprimiertes myogenes Regulatorprotein und gehört der „helix-loop-helix“ Familie nukleärer Proteine an. MyoD interagiert mit Id (Promega, Madison, USA).

- pBIND-Id:

Kontrollvektor, der das Gal4-Id-Fusionsprotein, gesteuert durch einen CMV-Promotor exprimiert. Das Segment einer murinen *id*-DNA kodiert dabei für die Aminosäuren 29-148 des Gesamtproteins. Die *id*-DNA ist in die MCS von pBIND in den Leserahmen von Gal4 kloniert. Id ist ein Negativ-Regulator myogener Differenzierung und gehört ebenfalls der „helix-loop-helix“ Familie nukleärer Proteine an. Id interagiert mit MyoD (Promega, Madison, USA).

- pACT-Rev:

Expressionsplasmid des VP16-Rev-Fusionsproteins. Das *rev*-Gen wurde über PCR aus pEG202pBsRev amplifiziert und isoliert. Dabei wurden an beiden Enden Sall-Schnittstellen hinzugefügt. Das *rev*-Fragment wurde über die Sall-Schnittstellen in die MCS von pACT im Anschluss an den offenen Leserahmen der VP16-Domäne kloniert. Das *rev*-Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert.

- pACT-Risp:

Expressionsplasmid des VP16-Risp Fusionsproteins. Die *risp*-DNA wurde mittels PCR aus pcDNA3.0-DKFZ amplifiziert und isoliert. Dabei wurden an beiden Enden BamHI-Schnittstellen hinzugefügt. Das *risp*-Fragment wurde in die MCS von pACT im Anschluss an den offenen Leserahmen der VP16-Domäne kloniert. Das *risp*-Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert.

- pBIND-Rev:

Expressionsplasmid des Gal4-Rev-Fusionsproteins. Das *rev*-Fragment wurde aus pACT-Rev mit SalI geschnitten und in die MCR von pBIND in den offenen Leserahmen der Gal4-Domäne kloniert. Das *rev*-Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert (Kerstin Lux, GSF, Neuherberg).

- pBIND-Risp:

Expressionsplasmid des Gal4-Risp-Fusionsproteins. Das *risp*-Fragment wurde aus pACT-Risp mit BamHI geschnitten und in die MCS von pBIND in den Leserahmen der Gal4-Domäne kloniert. Das *risp*-Fragment wurde auch in Gegenstrangorientierung kloniert (Kerstin Lux, GSF, Neuherberg).

- pACT-Crm1

Expressionsplasmid des VP16-Crm1-Fusionsproteins. Der Leserahmen des humanen Crm1/Exportins wurde mittels PCR (Primer 32297 und 32296) aus dem Vektor pCCrm1-sg143 amplifiziert und an beiden Enden mittels zusätzlicher Sequenzen in den Primern BamHI-Schnittstellen hinzugefügt. Die *crm1*-Sequenz wurde in die BamHI-Stelle der MCS von pACT in den Leserahmen von VP16 kloniert.

- pBIND-Crm1

Expressionsplasmid des Gal4-Crm1-Fusionsproteins. Der Leserahmen des humanen Crm1/Exportins wurde mittels PCR (Primer 32297 und 32296) aus dem Vektor pCCrm1-sg143 amplifiziert und an beiden Enden mittels zusätzlicher Sequenzen in den Primern BamHI-Schnittstellen hinzugefügt. Die *crm1*-Sequenz wurde in die BamHI-Stelle der MCS von pBIND in den Leserahmen von Gal4 kloniert.

2.5.5 Rev Expressionsplasmide

- pBsrev

Das Plasmid exprimiert Rev unter der Kontrolle der HIV-1 LTR (Neumann et al., 1995) und ist ein Derivat von pLsrev (Mermer et al., 1990). Der HIV-1 LTR/*rev*-Komplex wurde in den

Bluescript Vektor pBsPI integriert, da dieser Vektor in hoher Kopienzahl in E.coli repliziert werden kann (erhalten von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

- pBsrevM10BL

Die M10-Mutation (Aminosäurenaustausch im nukleären Exportsignal NES an Position 78 / 79 L E → D L) wurde mit Hilfe des Oligos 10582 in das Wildtyp *rev*-Gen eingeführt (Malim et al., 1989). Eine zusätzliche Insertion von 4 Aminosäuren (EDLP) zwischen Position 82 und 83 (BL-Mutation) ergab das Endkonstrukt, welches ein transdominant-negatives Rev-Protein unter der HIV-1 LTR Kontrolle exprimiert (Stauber, Gaitanaris, and G, 1995)(erhalten von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA).

- pCrev

Rev-Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die *rev*-Sequenz stammt aus einem HXB3 HIV-1 cDNA-Klon und wurde in den Basisvektor pBC12/CMV kloniert. Es sind keine Intronsequenzen im *rev*-Gen vorhanden (Malim et al., 1988). Das Plasmid wurde von Dr. B. Cullen, Durham, USA zur Verfügung gestellt.

- pCsrevsg143 (=pFRED-Rev)

Das *rev*-Gen wurde aus dem Vektor pBsRev mit Hilfe der Primer 19594/19595 amplifiziert und mit NheI geschnitten. Dieses Amplifikat wurde zunächst in den GFP-Vektor pFred25 kloniert (pCsRevsg25), später über dieselbe NheI-Schnittstelle in pFred143 (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg).

- pCsrevM10BLsg143

Die Rev-Mutante M10BL wurde aus pCsrevM10BLsg25 über NheI in pFred143 kloniert. Das Plasmid pCsrevM10BLsg25 wurde mit Hilfe der Plasmide pBsrevM10BL und pCsrevsg25GFP konstruiert. Das Konstrukt besitzt kein internes ATG. GFP wird daher nur in Zusammenhang mit dem *rev*-Gen exprimiert (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg).

- pFRED-Rev1-54

Plasmid, welches ein Fusionsprotein der ersten 54 Aminosäuren von Rev mit GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Hierzu wurde aus dem Plasmid pFRED-LacZ-Rev1-54(AgeI) die Sequenz des LacZ Gens welche von zwei AgeI-Schnittstellen flankiert wird, durch einen Restriktionsverdau herausgeschnitten und das so erhaltene Plasmid ohne LacZ religiert.

- pFRED-Rev1-54 4GFP

Plasmid, welches ein Fusionsprotein der ersten 54 Aminosäuren von Rev mit vier kompletten GFP-Sequenzen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (Barthelmes, 2001).

- pFRED-LacZ-Rev1-54(AgeI)

Plasmid, welches ein Fusionsprotein der ersten 54 Aminosäuren von Rev mit GFP und LacZ unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (Barthelmes, 2001).

2.5.6 Vektoren zur Promotoranalyse

- pL9B-R (=Risp)

Die 950 bp stromaufwärts des potenziellen ATG-Codons des KIAA0592-Gens wurden mittels PCR von dem BAC RP11-324H6 als Matrize amplifiziert. Durch die PCR wurde die spezifische Restriktionsschnittstelle NotI durch zusätzliche Sequenzen des 5' Primers pRisp-950(NotI)for (bindet an die bp -950 bis -922) und 3' Primers pRisp-1(NotI)rev (bindet an die bp -1 bis -26) beidseitig angefügt. Mittels dieser Schnittstellen wurde dann das 950bp lange Promotorstück in den pBL-Vektor vor das Luciferasegen kloniert. Die Promotorsequenz wurde zusätzlich in Gegenstrangorientierung pL9B-P (=Psir) kloniert. Dieses Konstrukt dient als Negativkontrolle der Promotoraktivität des positiv orientierten Stückes.

- pL2B-R (=Risp)

Die 2650 bp stromaufwärts des potenziellen ATG-Codons des KIAA0592-Gens wurden mittels PCR von dem BAC RP11-324H6 als Matrize amplifiziert. Durch die PCR wurde die spezifische Restriktionsschnittstelle NotI durch zusätzliche Sequenzen des 5' Primers pRisp-2650(NotI)for (bindet an die bp -2650 bis -2621) und 3' Primers pRisp-1(NotI)rev (bindet an die bp -1 bis -26) beidseitig angefügt. Mittels dieser Schnittstellen wurde dann das 2650 bp lange Promotorstück in den pBL-Vektor vor das Luciferasegen kloniert. Die Promotorsequenz wurde zusätzlich in Gegenstrangorientierung pL2B-P (=Psir) kloniert. Dieses Konstrukt dient als Negativkontrolle der Promotoraktivität des positiv orientierten Stückes.

- pGL3-ERV3

Sequenz der humanen C-Typ LTR von ERV3 wurde aus humaner genomischer DNA amplifiziert und in den promotor- und enhancerlosen pGL3-Vektor vor das Gen der „Firefly“-Luciferase kloniert (Frech, Danescu-Mayer, and Werner, 1997).

- pL3for

Die Sequenz der LTR des ERV3 wurde aus dem pGL3-ERV3 Plasmid mittels PCR (Primer 35511 und 35512) amplifiziert. Durch die PCR wurde die spezifische Restriktionsschnittstelle NotI durch zusätzliche Sequenzen an beiden Primern angefügt. Mittels dieser Schnittstellen wurde dann das ERV LTR-Promotorstück in den pBL-Vektor vor das Luciferasegen kloniert.

Die Promotorsequenz wurde zusätzlich in Gegenstrangorientierung (pL3rev) kloniert. Dieses Konstrukt dient als Negativkontrolle der Promotoraktivität des positiv orientierten Stückes.

2.5.7 Kontroll-, Klonierungs- und Reportervektoren

- **pBL**

Vektor mit der cDNA der „Firefly“-Luciferase ohne Promotor. Ausgangsvektor zur Klonierung von potenziellen Promotorsequenzen und Untersuchung deren Sequenz (Dr. Ulrike Schön, IMV, GSF-Neuherberg) (Schon et al., 2001).

- **pLRed(INS)R**

Expression des *DsRed* (*Discosoma spec.*) Gens unter der Kontrolle der HIV-1 LTR. Im 3' untranslatierten mRNA-Bereich befindet sich eine HIV-1 p17/p24 INS (Instabilitätssequenz) gefolgt von einem RRE („rev response element“). Die Expression von *DsRed* ist durch die LTR HIV-1 Tat- und durch das RRE Rev-abhängig (hergestellt von Horst Wolff, GSF, Neuherberg) (Wolff, 2003).

- **pLRed(2xINS)R**

Dieses Plasmid ist eine Weiterentwicklung des pLRed(INS)R. Es sind zwei p17/p24 INS in Reihe vorhanden, was zu einer geringeren Basisexpression des *DsRed* führt (hergestellt von Horst Wolff, GSF, Neuherberg) (Wolff, 2003).

- **pBsPl**

Bluescript-Vektor (Neumann et al., 1995), modifiziert von Stefan Schwartz im Labor von Dr. George Pavlakis, NCI, Maryland, USA.

- **pFred143 (KH1035)**

GFP-Expressionsplasmid. Das *gfp*-Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und enthält das SV40-Polyadenylierungssignal (Dr. Markus Neumann, GSF, Neuherberg).

- **pEGFP-1**

Promotorloser EGFP-Vektor. Der Vektor kodiert für eine nach rot verschoben fluoreszierende Variante des wildtypischen GFP, mit hellerer Fluoreszenz und stärkerer Expression, bei der durch stille Mutationen die kodierende Sequenz der menschlichen Codonbenutzung angepasst wurde (BD Biosciences Clontech, Düren).

- **pCR®2.1-TOPO**

PCR-Klonierungsvektor von Invitrogen, Karlsruhe. Der Vektor liegt geöffnet mit 3' überhängenden Thymidinresten und stabilisiert durch Topoisomerase vor.

- pPBGDTopo2.1

Aus humaner cDNA wurde ein ~1 kb großes Fragment des *pbgd*-Gens amplifiziert und in den Topo2.1 Vektor von Invitrogen kloniert (Christian Wufka, GSF, Neuherberg). Das Plasmid wurde als Template für die PBGD-Sonde verwendet.

- pPCR Script™ Amp SK+

PCR-Klonierungsvektor von Stratagene, Amsterdam, Niederlande. Der Vektor stammt von dem pBluescript® II SK(+) Phagemid ab. Zur MCS des Ursprungsvektors wurde eine SrfI-Restriktionsschnittstelle hinzugefügt. Der Vektor liegt SrfI geschnitten vor.

- pCCrm1-sg143

pFRED143-Vektor, welcher das humane *crm1*-Gen in einem Leserahmen mit der fluoreszenzverstärkten sg143-Mutante des GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert (etabliert von Dr. M. Neumann in der GSF-Neuherberg).

- pcDNA3

Eukaryotischer Expressionsvektor. Die Expression wird durch ein CMV-Promotor reguliert. Der Vektor besitzt T7 und SP6-Promotorsequenzen vor und nach der zur Verfügung stehenden MCS. Diese ermöglichen Sequenzierungsreaktionen und in vitro Transkriptionsexperimente. Der Vektor besitzt eine Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenz.

2.5.8 Bakteriell-artifizielles Chromosom (BAC)

- BAC RP11-324H6

Diese Sequenz wurde aus einem Teil der bakteriellen Klone des Contigs des menschlichen Chromosoms 10 vom Sanger Center, Cambridge, UK generiert. RP11-324H6 ist aus der RPCI-11.2 Klonbank, welche von der Gruppe von Pieter de Jong, BACPAC RESOURCES, OAKLAND, USA hergestellt wurde. RP11-324H6 enthält ein 200 kbp großes Fragment kloniert in den BAC Vektor pBACe3.6. Diese Sequenz stellt die genomische Anordnung der KIAA0592-mRNA dar.

2.6 Zelllinien

Bei allen Zelllinien (außer Jurkat: Suspension) handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die im Bezug auf ihr Wachstumsverhalten und ihre morphologischen Eigenschaften regelmäßig kontrolliert wurden.

- **HeLa**

Humane epitheloide Zervixkarzinomzelllinie (Fibroblasten). Die Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-7923).

- **HeLa Tat**

HeLa-Zellen, welche stabil-integriertes unter der Kontrolle der HIV-LTR stehendes HIV-1 Tat exprimieren (Schwartz et al., 1990).

- **HEK293**

Humane embryonale Nierenzelllinie („**H**uman **E**mbryonal **K**idney“), transformiert durch humane Adenovirus 5 (Ad5) DNA. Die Zellen enthalten und exprimieren die transformierenden Gene von Ad5 (Graham et al., 1977). Die Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-1573). Kürzlich wurde die Herkunft der Zelllinie aus Nierenzellen in Frage gestellt und eine mögliche neuronale Vorläuferzelle postuliert (Shaw et al., 2002)

- **Jurkat**

Humane akute T-Zell-Leukämiezelllinie (ATCC TIB-152).

2.6.1 Astrozytomzelllinien

- **85HG66**

Humane CD4-negative Astrozytomzelllinie (Brack-Werner et al., 1992; Stavrou et al., 1989; Stavrou et al., 1987), etabliert aus einem Gehirntumor (Astrozytom).

- **U251 MG**

Humane Astrozytomzelllinie aus einem „Glioblastoma multiforme“. Die Zelllinie ist GFAP positiv (Besnard et al., 1991; Bigner et al., 1981).

- U373 MG

Humane CD4-negative Astrozytom-/Glioblastomzelllinie aus einem Tumor III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-17) (Dewhurst et al., 1987 b; Dewhurst et al., 1987 a; Harrington and Geballe, 1993).

- U87 MG

Humane Astrozytom-/Glioblastomzelllinie aus einem Tumor III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-14) (Bagasra et al., 1992).

- U138 MG

Humane Glioblastomzelllinie aus einem astrozytären Gliom III. Grades. Die Zellen wurden von ATCC bezogen (ATCC HTB-16) (Bagasra et al., 1992; Chiodi et al., 1987).

2.7 Bakterienstämme

- XL-10 Epicurian Coli/ XL-10 Epicurian Coli Ultra Kan⁺

Kompetente, super-kompetente und ultra-kompetente Zellen zur chemischen Transformation (cfu= 1×10^8 - 5×10^9 /μg, / $\geq 5 \times 10^9$ /μg Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

- TOP10F'

Kompetente Zellen zur chemischen Transformation (cfu= 1×10^8 - 5×10^9 /μg). Dieser Stamm überexprimiert den Lac-Repressor (*lacI_q*-Gen). Um eine Blau/Weiß-Selektion, gesteuert durch den Lac-Promotor, durchzuführen, wird IPTG in den Agarplatten benötigt (Invitrogen, Karlsruhe).

2.8 Spezialsoftware

Axiovision 3.0

Carl Zeiss Vision, Halbergmoos

CellQuest und CellQuest Pro

BD Biosciences, Düren

Endnote 6.0	Niles Software, USA
Gene Construction Kit 2.x	Textco-SciQuest, Triangle Park, USA
IPlab 4.0	Scanalytics, Fairfax, USA
MacVector 6.5.1	Accelrys, SanDiego, USA
Prism 2.0b for Mac	GraphPad, SanDiego, USA
Prism 3.0 for Windows	GraphPad, SanDiego, USA
Quantity One 4.2.1	Biorad, München
Simplicity 2.0R1	Berthold Detection Systems, Pforzheim

2.9 Spezialgeräte

Celloobserver	Mikroskopiestation	Carl Zeiss, Jena
Chemidoc	Geldokumentation	Biorad, München
CompInject AIS2	Mikroinjektionssystem	Cell Biology Trading, Hamburg
FACScalibur	FACScan	BD Biosciences, Düren
ORION	Luminometer mit 2 Injektoren	Berthold Detection Systems, Pforzheim
„ProQuaLo“	Mikroskop, Zusatzkomponenten	Carl Zeiss, Jena,
STORM	Phosphoimager	Amersham Pharmacia, Freiburg

3 Methoden

3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen und Zellzahlbestimmung

Alle permanenten Zelllinien wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die Medien (s. Kapitel 2.2.6) enthielten, falls nicht anders angegeben, 10 % FKS und 1 % antibiotische/antimykotische Lösung. Bei allen Kulturen (außer Jurkat = Suspensionskultur) handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die zweimal pro Woche umgesetzt wurden. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen durch Behandlung und mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:2 bis 1:20 in frischem Medium aufgenommen und eingesät.

Für Experimente, in denen eine bestimmte Zellzahl eingesetzt werden sollte, erfolgten Zellzahlbestimmungen. Zur Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer (MD-Kova Raster 10, Madaus Diagnostik) wurden 10 µl der Zellsuspension verwendet. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Anzahl der Zellen pro Großquadrat (entspricht 9 Kleinquadraten) bestimmt werden. Der mit 10⁴ multiplizierte Wert ergab die Zellzahl/ml.

3.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut, in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension in Kulturflaschen überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen expandiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und nach Zellzahlbestimmung in 50 ml Falcon Röhrchen 10 min bei 350 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Einfriermedium (s. Kapitel 2.2.6) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von 1x10⁶ bis 1x10⁷ Zellen/ml in Nunc-Cryo-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Im Kryostaten wurden die Zellen um 1°C pro Minute auf -30°C abgekühlt und anschließend ü/n bei -80°C gehalten. Die Zellen konnten in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert werden.

3.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA

3.1.3.1 Kalziumphosphat Kopräzipitationsmethode

Zur Transfektion wurde die CaPO_4 -DNA-Kopräzipitationsmethode nach Graham (Graham et al., 1977) mit Modifikationen von Felber (Felber, Drysdale, and Pavlakis, 1990) angewandt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden ausgehend von Zellgröße, Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit $4\text{-}8 \times 10^5$ Zellen/60 mm Petrischale eingesät. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, in PBS gewaschen und mit Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Die optimale Menge Medium pro 60mm Schälchen betrug 4ml. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10 % FKS und 1 % AB/AM-Lösung verwendet. Nach 24h Zellwachstum wurden die Zellen transfiziert. Die Zellen sollten zu 60 % subkonfluent gewachsen sein, um optimale Transfektionseffizienzen zu erzielen. Die Transfektionen wurden mit dem "CellPhect"-Transfektionskit von Pharmacia durchgeführt.

Pro Transfektionsansatz wurde ein Mastermix hergestellt. Dazu wurden die Plasmidlösungen vorgelegt (Gesamt-DNA immer 16 μg pro 60 mm Schälchen) und vorsichtig 1:1 mit Puffer A versetzt. Es wurde gereinigtes Plasmid verwendet (Qiagen, Macherey-Nagel). Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-PufferA-Mischung in den vorgelegten Puffer B (immer doppelte Menge von Puffer A) unter ständigem leichten Luftstrom eingetropft und nochmals 15min inkubiert.

Gefäß	60mm	30mm/6Lochplatte	12 Lochplatte	24 Lochplatte	96 Lochplatte
Zellzahl	$2\text{-}5,0 \times 10^5$	$1\text{-}2,0 \times 10^5$	$0,2\text{-}1,0 \times 10^5$	$0,5\text{-}1,0 \times 10^4$	1×10^3
Medium	4,0 ml	2,0 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,05 ml
Gesamt-DNA	16 μg	8 μg	2 μg	0,8 μg	0,02 μg
Puffer A/B	120/240 μl	60/120 μl	15/30 μl	6/12 μl	1,5/3 μl

Tabelle 3.1.1: Mengenangaben zur Durchführung einer Transfektion in verschiedenen Zellkulturgefäßen

Das Gemisch wurde vorsichtig unter das Medium der eingesäten Zellen pipettiert. Nach 4h Inkubation bei 37°C , wurde das Medium abgenommen und frisches DMEM

zugegeben. Die Zellen konnten 48 h nach Transfektion geerntet werden. Mit der CaPO_4 -DNA-Kopräzipitationsmethode ließen sich, abhängig von den transfizierten Zelllinien, Transfektionseffizienzen von 10 % bis zu 80-90 % (HEK293-Zellen) erzielen.

Die Transfektionseffizienz wurde zum einen über Kotransfektion mit einem Luciferase-Expressionsplasmid bestimmt (s. Luciferase Assay), zum anderen konnte die Expression von GFP-gekoppelten Proteinen in den Zellen direkt im Lichtmikroskop nachgewiesen oder prozentual im FACS bestimmt werden.

3.1.3.2 Das FuGENE™6 Transfektionsreagenz

Transfektionen vor allem für Lokalisationsstudien wurden mit dem FuGENE™6 Transfektionsreagenz von Roche durchgeführt. Die Transfektionseffizienz liegt bei dieser Methode zwischen 15 % (bei 85HG66) und 90 % (bei HEK293) und somit gleich oder höher als bei der CaPO_4 -Methode. Über das Prinzip der DNA-Aufnahme in die Zellen liegen von Roche Molecular Biochemicals keine weiteren Informationen vor. Das gewünschte Plasmid wurde in einem Volumen von 10 µl in ein Eppendorf Gefäß vorgelegt. In ein zweites Gefäß wurden (für die Transfektion in einem 30 mm Schälchen) 100 µl serumfreies Medium (DMEM) vorgelegt.

Pro µg zu transfizierender DNA wurden 3 µl FuGENE™6 in das Medium gegeben und nach 5 min Inkubation auf die DNA-Lösung gegeben. Der Mix wurde 15 min inkubiert und dann gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Für $1-2 \times 10^5$ Zellen in einem 30 mm Schälchen wurden je nach Versuch 0,1-1,0 µg DNA transfiziert. Nach mindestens 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen für die weiteren Untersuchungen behandelt oder geerntet.

3.1.4 Immunfluoreszenz an fixierten Zellen

Um die Expression und Lokalisation zellulärer oder viraler Antigene auf Einzelzelebene nachzuweisen, wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt (Ludwig et al., 1999).

Für den Nachweis endogener zellulärer Antigene wurden die Zellen subkonfluent in 60mm Petrischälchen oder 35 mm Petrischälchen mit Glasboden eingesät und ü/n bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 3.7 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS 10-20 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS 3x gewaschen und mit PBS+0.1 % NP-40 für 5-7 min bei RT permeabilisiert. Für den Nachweis transfizierter exogen von einem Vektor exprimierter Antigene wurden die Zellen subkonfluent in 60 mm Petrischälchen eingesät und ü/n bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am nächsten

Tag wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen. Weitere 24 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gespült, mit 3.7 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS 10-20min bei RT fixiert und nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS durch 0.1 % NP-40 in PBS 5-7min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden nun wieder dreimal mit PBS gewaschen und danach mit den entsprechenden 1. Antikörpern in Verdünnungen von 1:20-1:200 inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 min mit dem 1. Antikörper bei 37°C wurden die Zellen erneut 3x mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte bei Verdünnungen von 1:100-1:200, 1 h bei 37°C oder Raumtemperatur. Der 2. Antikörper war spezifisch gegen IgG-Antikörper der Spezies in welcher der 1. Antikörper hergestellt worden war. Zusätzlich waren diese Antikörper gekoppelt an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (grün) oder Cy3 (rot). Als Vergleich mit einer zellulären Struktur wurde in verschiedenen Experimenten der Zellkern mit Hoechst33342 angefärbt. Dazu wurde der Farbstoff 1:50000 in den letzten Waschschrift nach der zweiten Antikörperinkubation gegeben und 5min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop photographiert. Folgende Farbstoffe wurden verwendet:

FITC: Anregungswellenlänge 495 nm, Emissionswellenlänge 525 nm

Cy3: Anregungswellenlänge 552 nm, Emissionswellenlänge 570 nm

Hoechst33342: Anregungswellenlänge 300-400 nm, Emissionswellenlänge 425-525 nm

Der Nachweis von Rev oder Risp erfolgte durch Inkubation eines monoklonalen Ratte anti-Rev bzw. anti-Risp Antikörpers (s.3.2.2, Verd.1:50 bis 1:100) für 1 h und anschließender Inkubation eines FITC-gekoppelten Ziege anti-Ratte Antikörpers (1:100) für 40-60 min bei Raumtemperatur. Als Kontrolle für eine Hintergrundfärbung wurden die Zellen jeweils nur mit dem markierten sekundären Antikörper behandelt.

3.1.5 Behandlung von Zellen mit Leptomycin B (LMB)

Die Chemikalie LMB inhibiert spezifisch den Crm1-abhängigen Kernexport von Proteinen (Bogerd et al., 1998; Kudo et al., 1998; Wolff, Sanglier, and Wang, 1997). Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und 24 h im Brutschrank inkubiert. LMB wurde in einer Endkonzentration von 10 nM ins Medium gegeben und die Zellen für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakt hergestellt oder fixiert und mikroskopische Aufnahmen gemacht. Dabei wurde immer ein Parallelansatz mit unbehandelte Zellen durchgeführt.

3.1.6 FACS-Analyse

Durch eine Analyse mit einem „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) können Zellen anhand ihrer strukturellen und besonders ihrer fluoreszierenden Eigenschaften einzeln in einer Zellsuspension untersucht werden.

Bei dem FACScalibur Gerät werden durch einen Laserstrahl an Antikörper gekoppelte oder in Nukleinsäuren interkalierende Farbstoffe oder transfizierte Fluoreszenzproteine zur Emission angeregt und diese Fluoreszenz elektronisch erfasst. Zusätzlich kann der FACScalibur auch noch die Größe der Zellen durch den sogenannten „Forward Side Scatter“ (FSC), d.h. die Ablenkung des Lasers nach vorne, und die Granularität durch den sogenannte „Sideward Scatter“ (SSC), d.h. die Streuung des Lasers zur Seite, erfassen. Die so ermittelten Daten können als „eindimensionale“ (eine Fluoreszenz gegen Zellzahl) Histogramme oder als zweidimensionale (= zwei Fluoreszenzen) sog. „Dot-Plots“ dargestellt werden. Bei der Messung und Auswertung mittels der Software CellQuest™ von Becton Dickenson können die lebenden Zellen über Größe und Granularität eingegrenzt werden. Diese Begrenzungen („gates“) können außerdem um jede Population gesetzt werden, die auf einzelne Parameter hin untersucht werden soll.

Gemessen wurden über das Computerprogramm „Cell Quest™“ Zellen, die nach Transfektion mit Expressionsplasmiden das grüne Fluoreszenzprotein GFP oder das rote Fluoreszenzprotein DsRed, bzw. beide Proteine exprimieren. Aufgenommen wurden die Daten von $1-1,5 \times 10^5$ Zellen, die als Lebendzellpopulation eingegrenzt wurden („Live Gate“). Für die FACS-Analyse wurden adhärent wachsende Zellen zweimal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 350 g wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Die Proben wurden vor dem Messen am FACScalibur von BD Biosciences so mit FACSflow verdünnt, dass etwa 1000 Zellen pro Sekunde bei der höchsten Durchflussgeschwindigkeit gemessen werden können.

3.1.7 Rev-Funktionsanalysen

Die Funktion von Rev im viralen Replikationszyklus in eukaryotischen Zellen besteht im Export von bestimmten RNA Populationen aus dem Kern. Zur Analyse dieser Rev Funktion wurde ein System verwendet, das auf einer Rev- und Tat-abhängigen Expression des rot-fluoreszierenden Reporterproteins DsRed basiert (Wolff, 2003). Tat abhängig wird die Expression dadurch, dass die Transkription unter der Kontrolle der HIV-1 LTR steht. Die Translation des Reportergens von der entstandenen mRNA ist Rev abhängig, da sich auf der mRNA Sequenz im untranslatierten Bereich Instabilitätselemente (1-2x INS) und die RRE befinden. Ohne Rev erfolgt dabei keine effiziente Expression der DsRed-mRNA. Um die Rev Funktion zu testen, wurden Rev

Expressionsplasmide und das Reporterkonstrukt in Hela-Tat Zellen transient transfiziert. Es wurden nur rot fluoreszierende Zellen fotografiert oder im FACS ausgewertet, welche auch grün fluoreszierten. Daher musste sicher gestellt werden, dass in allen Ansätzen immer die gleiche Menge an GFP exprimiert werden konnte. Entweder wurde dies durch Fusionskonstrukte, wie beispielsweise RevGFP oder durch Kotransfektion eines GFP-exprimierenden Plasmid erreicht. Die Expression der DsRed kann dann abhängig von einem funktionalen Rev gemessen werden. Für eine qualitative Analyse wurden Bilder im inversen Mikroskop mit verschiedenen digitalen Kameras vom Phasenkontrast, der grünen Fluoreszenz und der roten Fluoreszenz, aufgenommen. Als Positivkontrolle diente ein RevGFP-Expressionsvektor, als Negativkontrolle ein GFP-Expressionsvektor. Zur quantitativen Analyse wurde im FACS die Anzahl der Zellen mit roter Fluoreszenz, in der rot-grün doppelt positiven Population ausgewertet.

3.1.8 Mikroinjektion von Peptiden in Zellen

Zur Durchführung von Mikroinjektionen (Demart, 2003; Neumann et al., 2001), wurden am Vortag $1-3 \times 10^5$ Zellen in Glasbodenzellkulturschalen eingesät. BSA-Alexa Fluor 568 konjugierte Peptide (Molecular Probes, s. Kap. 3.3.6) in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS wurden in das Zytoplasma oder den Zellkern mit Hilfe des automatisierten Injektionssystems CompInject mikroinjiziert. Als interne Injektionskontrolle wurde BSA-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, s. Kap. 3.3.6) in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS koinjiziert. Zwei bis drei Stunden nach der Injektion wurden die Zellen fixiert (s. Kap. 3.1.4), an einem inversen Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert (s. Kap. 3.1.9).

3.1.9 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopie von fixierten oder lebenden Zellen, die fluoreszierende Proteine exprimieren, denen fluoreszierende Proteine injiziert wurden oder die mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert wurden, geschah in den Grundzügen wie bereits in der Literatur beschrieben (Lee et al., 1999; Neumann et al., 2001). Zellen wurden in Kulturschälchen ausgesät, transfiziert oder injiziert und nach einer Inkubation von 24-48 h lebend oder fixiert mikroskopiert. Für eine Lebendbeobachtung wurden die Zellen während des Vorgangs in einer Inkubationskammer auf dem Mikroskop gehalten. Digitale Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20fach bis 32fach mit einer gekühlten CCD-Kamera aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass zu vergleichende Bilder unter den gleichen Bedingungen, wie Filter, Belichtung und Vergrößerung aufgenommen wurden.

3.1.10 Quantifizierung von fluoreszierenden Proteinen in der Zelle

3.1.10.1 Quantifizierung der Lokalisation in der Zelle

Die Quantifikation zellulärer Proteine, nach Transfektion oder indirekter Immunfluoreszenz, wurde im Prinzip wie bereits beschrieben durchgeführt (Demart, 2003; Lee et al., 1999; Neumann et al., 2001).

Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, nach 48 h fixiert (s. Kap.3.1.4) und mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Vor der Fixierung kann noch eine Leptomycin B Behandlung durchgeführt werden. Von jeder zu untersuchenden Zellpopulation wurde eine Anzahl von jeweils drei verschiedenen Bildern aufgenommen: GFP-Fluoreszenz, Phasenkontrast und die Fluoreszenz der Kernfärbung (Hoechst 33342). Die Abbildung 3.1.1 zeigt ein Beispiel der Eingrenzung der unterschiedlichen Kompartimente und eines Kontrollbereiches. Diese Eingrenzung diente zur Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten und der zugehörigen Flächen.

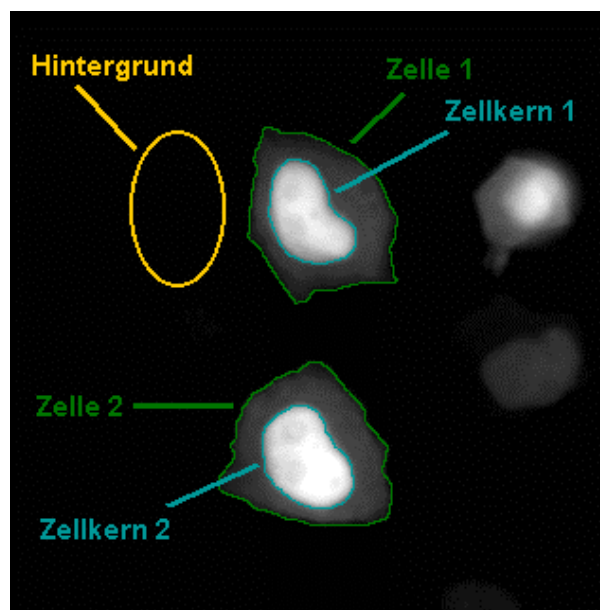


Abbildung 3.1.1: Beispiel für die Segmentierung der zu quantifizierenden Bilder. Grün eingegrenzt ist der Zellumriss (erstellt anhand des Phasenkontrastbildes), blau definiert den Zellkern (anhand der Hoechst33342-Kernfärbung) und das gelbe Segment definiert einen Hintergrundbereich als Vergleich. Die erstellten Segmente wurden auf das GFP-Fluoreszenzbild überlagert und die Quantifizierung der Fluoreszenz wurde durchgeführt.

Durch das Programm IPlab konnte die mittlere Pixelintensität bezogen auf die Fläche der jeweiligen Kompartimente ermittelt und verglichen werden.. Nach folgender

Formel wurde der prozentuale Anteil der Lokalisation im Kern berechnet (Neumann et al., 2001).

$$\% \text{ Fluoreszenz im Kern} = \frac{(\mathbf{I}_{\text{Kern}} \times \mathbf{A}_{\text{Kern}}) - (\mathbf{I}_{\text{Hintergrund}} \times \mathbf{A}_{\text{Kern}})}{(\mathbf{I}_{\text{Gesamt}} \times \mathbf{A}_{\text{Gesamt}}) - (\mathbf{I}_{\text{Hintergrund}} \times \mathbf{A}_{\text{Gesamt}})} \times 100 \%$$

\mathbf{I}_{Kern}	=	Fluoreszenz im Kern (=mittlere Pixelintensität)
$\mathbf{I}_{\text{Gesamt}}$	=	Fluoreszenz der gesamten Zelle (=mittlere Pixelintensität)
$\mathbf{I}_{\text{Hintergrund}}$	=	Fluoreszenz in einem Kontrollbereich innerhalb des gleichen Sichtfeldes (=mittlere Pixelintensität)
\mathbf{A}_{Kern}	=	Fläche des Kerns (Anzahl der Pixel)
$\mathbf{A}_{\text{Gesamt}}$	=	Fläche der gesamten Zelle (Anzahl der Pixel)

Tabelle 3.1.2 zeigt am Beispiel der Zellen in Abbildung 3.1.1 die Berechnung der prozentualen Fluoreszenz im Kern.

Segment	Fläche (Pixel) \mathbf{A}	gemessenes Fluoreszenz \mathbf{I}	Hintergrund des Segments $\mathbf{I}_{\text{H}} \times \mathbf{A}_{\text{H}}$	korrigiertes Fluoreszenz $\mathbf{I} \times \mathbf{A} - \mathbf{I}_{\text{H}} \times \mathbf{A}_{\text{H}}$	Anteil an der Gesamt- fluoreszenz
Zelle 1 gesamt	5430	5337289	1155110	4182179	100.00 %
Zellkern 1	1804	3560606	383760	3176845	75.96 %
Zelle 2 gesamt	5730	6681885	1218928	5462956	100.00 %
Zellkern 2	1969	4662580	418860	4343719	77.68 %

Tabelle 3.1.2: Ergebnis der Quantifizierung der in Abbildung 3.1.1 dargestellten Zellen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde wie folgt berechnet: (Gesamtintensität der Pixel im Segment „Hintergrund“ / Fläche des Segments „Hintergrund“) x (Fläche des jeweiligen Segments).

3.1.10.2 Quantifizierungen der Transportaktivität von Peptiden

Zur Quantifizierung der Transportaktivität von Peptiden wurden diese als Konjugate mit BSA und einem fluoreszierenden Farbstoff in Zellen mikroinjiziert (Kap.3.1.8). Für die Fluoreszenz der injizierten Peptide und der koinjizierten BSA-Kontrolle wurde der prozentuale Anteil der Fluoreszenz im Kern ermittelt (Kap. 3.1.10.1). Anhand der Lokalisationen der Peptidkonjugate im Vergleich zu BSA wurde eine Kalkulation der

Import- und Exporteigenschaften durchgeführt. Zur Bewertung der Lokalisation der Peptide wurde der Transportquotient berechnet:

$$\text{Transportquotient} = \frac{\% \text{ Fluoreszenz im Kern des Peptides nach der Inkubation}}{\% \text{ Fluoreszenz im Kern der BSA-Kontrolle nach der Inkubation}}$$

Werte des Transportquotienten, die größer als 1 waren, zeigten eine stärkere Akkumulation des Peptides im Vergleich zu BSA im Kern, also ein Importverhalten. Werte die kleiner als 1 waren, zeigten eine stärkere Akkumulation des Peptides im Vergleich zu BSA im Zytoplasma, also ein Exportverhalten.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial

Die hier beschriebene Methode wurde angelehnt an das Protokoll DNeasy der Qiagen GmbH, Hilden durchgeführt. Dabei wurden bis zu 5×10^5 Zellen, mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen. Nun wurde 4 μ l RNase A (100 mg/ml) hinzugegeben und 2 min inkubiert um später RNA-freie genomische DNA zu erhalten. Danach wurden 200 μ l des Puffers AL und 20 μ l Proteinase K auf die Zellen gegeben, kräftig gemischt und bei 70°C 10 min inkubiert. Anschließend wurde 200 μ l 98 % EtOH zugegeben und wiederum gevortext. Diese Mischung wurde inklusive eines eventuell auftretenden Präzipitates auf eine DNeasy Zentrifugationssäule geladen und bei maximaler Geschwindigkeit 1min zentrifugiert. Der so erhaltene Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt, 500 μ l Puffer AW1 zugegeben und wiederum 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um einen zweiten Waschschriff durchzuführen wurden nun 500 μ l des Puffers AW2 zugegeben und 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt, 200 μ l Puffer AE hinzugegeben, 1 min inkubiert um die genomische DNA gebunden an der Säule wieder zu eluieren und die Säule 1 min bei 8000 g zentrifugiert.

3.2.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Die hier beschriebene Methode wurde nach dem Protokoll der Qiagen GmbH, Hilden durchgeführt. Die DNA wurde für Transfektionen und alle Standardmethoden der Molekularbiologie eingesetzt.

Über Nacht bei 37°C gewachsene Bakterienkulturen wurden zentrifugiert und das Bakterienpellet durch eine alkalische SDS-Lösung aufgeschlossen. Proteine wurden durch saures Kaliumacetat ausgefällt. Die DNA befand sich im Überstand und wurde über eine Anionenaustauscher-Säule (Qiagen GmbH, Hilden) zunächst gebunden. Durch zweimaliges Waschen wurde die gebundene DNA von Verunreinigungen befreit und konnte anschließend eluiert werden. Die gefällte pDNA wurde in A.d. oder 1x Tris-Puffer pH 8,5 aufgenommen.

3.2.3 Plasmidgroßpräparation

Für eine Plasmidgroßpräparation wurden 5 ml LB-Medium + 5 µl Ampicillin (50 mg/ml Stocklösung) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ca. 6-8 h in einem 37°C Schüttler inkubiert. Nach einer Verzögerungsphase von 1-2 h erreichten die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase. Die Bakteriendichte konnte anhand einer Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Bakterien vor dem Erreichen der stationären Phase in einen großen Glaskolben mit 300-500 ml LB-Medium + 500 µl Ampicillin (50 mg/ml Stocklösung) überführt wurden, da die Bakterien bei zu hoher Dichte ihr Wachstum einstellen, bzw. absterben würden. Die Bakteriensuspension wurde ü/n bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden am nächsten Tag 20 min bei 5000g zentrifugiert und das Bakterienpellet eines Zentrifugenbechers in 12 ml kaltem Puffer P1+RNaseA (100 µg/ml Endkonzentration) resuspendiert. Die Isolation wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Es konnten somit 50-500 µg pDNA aus einer 100 ml Bakterienkultur isoliert werden.

Die DNA-Konzentration konnte in einem UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und auf µg/µl eingestellt werden. Nach Sambrook (Sambrook, 1989) entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA bei 260 nm einer Absorption von 1. Zur Überprüfung der Reinheit des DNA-Materials wurde die Absorption zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet. Bei reinen DNA-Präparationen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2.

Alternativ hierzu wurde die Plasmidgroßpräparation mit dem Nucleobond Kit AX500 von Macherey-Nagel, Düren durchgeführt.

3.2.4 Plasmidkleinpräparation

Von einer Transformationsplatte wurde 1 Bakterienkolonie gepickt und in 3-5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (50 mg/ml Stocklösung) angeimpft. Nach ü/n Inkubation in einem 37°C Schüttler wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in Eppendorf-Reagenzgefäßen 5min bei 4500g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (Kap. 3.2.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde die Bakteriensuspension 5min bei RT inkubiert und die Bakterien aufgeschlossen. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P3 wurden die Proben für 5-10 min auf Eis gestellt und dadurch die Proteine ausgefällt. Die ausgefällten Proteine wurden 15 min bei 25000g zentrifugiert, die Überstände mit der DNA in neue Eppendorf-Reagenzgefäße überführt. Die DNA konnte nun mit Isopropanol gefällt werden. Das getrocknete DNA Pellet wurde in 25-50 µl A.d. aufgenommen. Die DNA-Ausbeute lag zwischen 5 und 15 µg pro 1,5 ml ü/n Bakterienkultur.

3.2.5 DNA-Restriktionsverdau

Alle Restriktionsverdaus wurden mit Enzymen der Firmen Roche Diagnostics, Mannheim und New England Biolabs, Schwalbach durchgeführt. Die für ein Enzym jeweils optimalen Pufferbedingungen wurden durch Verwendung eines geeigneten 10fach-Reaktionspuffers der gleichen Firma erreicht. Die Temperatur und die Zeitdauer einer Reaktion sowie die Enzymkonzentrationen waren abhängig von der eingesetzten DNA-Menge, von den verwendeten Enzymen sowie von der Anzahl und Größe der erwarteten DNA-Fragmente. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe eines Probenauftragspuffers (s. Kapitel 1.2) gestoppt. Die aus den Bakterien isolierte, gefällte und gereinigte Plasmid-DNA wurde auf einem TAE-Gel (s. Kapitel 3.2.6) überprüft. Die getesteten Plasmide wurden für Klonierungszwecke eingesetzt. Wichtige Plasmide für Transfektionsversuche wurden durch Sequenzanalysen überprüft.

Ansatz für Restriktionsverdau:

pDNA	1 µg
10x Reaktionspuffer	2 µl
Enzym(e) 10 Units	1 µl
A.d.	ad 20 µl

Wurde mehr als 1 µg Plasmid-DNA geschnitten, z.B. für Ligationsansätze (Vektor- und Insertpräparation benötigen 3-5 µg Plasmid-DNA), wurde das Endvolumen auf 30-100 µl A.d. erhöht. Die Endkonzentration des Restriktionspuffers wurde immer auf 1fach verdünnt.

3.2.6 Agarosegelelektrophorese (AGE)

Mit der Agarose Gelelektrophorese konnten DNA Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden (Sambrook, 1989). Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurden 10 µg Ethidiumbromid/100 ml TAE-Gel verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und wird unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Der Laufpuffer enthielt ebenfalls Ethidiumbromid (0,1 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe und Konzentration des Gels bei Spannungen zwischen 50V und 100V in horizontalen Gelkammern. Die Größe der DNA wurde anhand eines Längenstandards (z.B. 1kb-Leiter von Roche Diagnostics, Mannheim oder 2log Standard von New England Biolabs, Schwalbach) ermittelt.

Prozent Agarose	DNA-Fragmente
0,6	20 kb-2,0 kb
0,8	10 kb-1,0 kb
1,0	8 kb-0,5 kb
1,5	3 kb-0,2 kb
2,0	2 kb-0,1 kb
3,0	<0,1 kb

Tabelle 3.2.1: Verwendete Agarosegelkonzentrationen für DNA-Fragmente bestimmter Größe.

3.2.7 DNA-Isolierung aus Agarose Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose Gelen zu isolieren, wurden die durch EtBr unter UV Licht sichtbaren Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA nur so kurz wie möglich der schädigenden UV-Strahlung ausgesetzt ist. Das ausgeschnittenen Stück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Isolierung fand nach dem Protokoll von Macherey-Nagel mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen statt. Dabei wurden je 100 mg des Gels zuerst 300 µl (bei Gelen mit mehr als 2 % Agarose 600 µl) eines chaotropen Puffers NT1 zugegeben und 10 min, oder bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat, bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Mischung auf eine Säule mit einer Silica-Membran gegeben und 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Dabei bleibt die DNA an der Membran gebunden. Die Membran wurde dann zuerst mit 500 µl Puffer NT2, dann mit 600 µl Puffer NT3 und dann mit 200 µl NT3 nacheinander jeweils 1 min bei 11000g zentrifugiert und somit von Rückständen gereinigt. Die Elution erfolgte mit 50 µl Puffer NE oder A.d. durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 1 min bei 11000

g. 10 µl der eluierten DNA Lösung wurden zur Kontrolle auf ein weiteres Agarose Gel aufgetragen und die Konzentration abgeschätzt.

3.2.8 Ligationstechniken

Durch Ligation wurden DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren eingefügt. Es wurde die T4-DNA-Ligase und 10fach Ligationspuffer von Life Technologies, Eggenstein oder New England Biolabs, Schwalbach verwendet. Das molare Verhältnis Vektor zu Insert lag je nach Konzentration der DNA-Fragmente (20-60 ng/µl) bei 1:2 bis 1:4. Um bei Ligationen eine mögliche Religation von 3'- und 5'-Enden bei glatten Enden („blunt ends“) oder kompatiblen Restriktionsschnittstellen zu vermeiden, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Ein Reaktionsansatz enthielt 10 % 10fach Dephosphorylierungspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim), eine Einheit (1 U) alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und bis zu 1 µg DNA-Fragmente. Die Reaktion erfolgte 30 min bei 37°C. Die alkalische Phosphatase wurde für 10 min bei 65°C mit 50 mM EDTA inaktiviert oder durch eine Gelaufreinigung entfernt.

Ansatz für Ligation mit der T4 Ligase von Life Technologies:

Vektor/Insert	2-6/ 1µl
10x Ligationspuffer	1 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
A.d.	ad 10 µl

Die Ligrationsreaktion erfolgte in einem Volumen von 10 µl ü/n bei 14-16°C unter Wasser um eine gleichmäßige Temperatur zu garantieren.

Ansatz für Ligation mit der T4 Ligase von New England Biolabs:

Vektor/Insert	2-6/ 1 µl
10x Ligationspuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
A.d.	ad 20 µl

Die Ligrationsreaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl 10-30 min bei RT.

3.2.9 Klonierungstechniken

3.2.9.1 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden kompetente, superkompetente oder ultrakompetente XL10 Gold Epicurian Coli[®] von Stratagene, Amsterdam, Niederlande verwendet (s Kapitel 2.7). Die Reaktionen wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und aliquotiert. Nach Zugabe von 1 µl 1,4 molares β-Mercaptoethanol (Stratagene) pro 100 µl erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Anschließend wurden 1-2 µl DNA eines Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben. Nach 30 min auf Eis wurden die Bakterienzellen einem Hitzeschock unterzogen (30-60 s bei 42°C) und erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurde die Plasmid-Bakteriensuspension für 30 min in einem 37°C-Schüttler inkubiert.

Aliquots von 50 µl und 400 µl wurden auf LB-Ampicillin Agarplatten (50µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ü/n in einen 37°C Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurden die Platten auf Bakterienkolonien überprüft und das Kolonienverhältnis Ligation Vektor/Insert zur Kontrollligation Vektor ohne Insert bestimmt. Anschließend wurden Einzelkolonien gepickt und in 1-3 ml LB-Medium mit Ampicillin (s.o.) ü/n in einem 37°C-Schüttler inkubiert. Nach DNA-Isolierung und Restriktionsverdau oder PCR Analyse konnte bestimmt werden, ob das Insert im Vektor in der richtigen Orientierung enthalten war.

3.2.9.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA nach der Lithium-Acetat Methode

Die LiAc Methode beruht auf der Eigenschaft von *S. cerevisiae* Zellen, dass Kationen der Alkalifamilie die Zellen kompetent für die Aufnahme von DNA machen. Dadurch werden hohe Transformationseffizienzen von 10^4 bis 10^6 Transformanten pro µg DNA erzielt.

Zwei Tage vor der Durchführung wurden einzelne EGY48 Hefekolonien in 5 ml YPD Medium oder CM-Selektionsmedium inokuliert und ü/n bei 30°C bis zur Sättigungsphase inkubiert. Ein Tag vor der Transformation wurde 25µl der Hefekultur in 50 ml des Mediums überführt und in einem 1 l Schikanekolben bei 30°C ü/n inkubiert. Die Hefe sollte dabei etwa auf 1×10^7 Zellen pro ml Dichte (= OD₆₀₀ von 0,3-0,5) wachsen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen auf 1×10^6 ml verdünnt und für zwei weitere Wachstumsphasen kultiviert (2-5 h, bei regelmäßiger OD-Messung). Danach wurden die Hefezellen durch eine Zentrifugation von 5 min bei 5000 U/min in einem Sorvall GS Rotor geerntet, in 10 ml sterilen A.d. aufgenommen, in kleinere

Zentrifugationsröhrchen überführt, wiederum 5 min bei 7000 U/min in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert und das Sediment in 1,5 ml kurz zuvor frisch zubereiteten LiAc-Puffer aufgenommen.

Die kompetenten Hefezellen konnten so bis zu zwei Wochen bei 4°C aufgehoben werden. Zur Transformation wurden 200 µg hochmolekularer Träger-DNA (Ultraschall zerkleinerte Lachssperma-DNA) mit 5 µg der zu transformierenden DNA in einem Volumen von 20 µl gemischt. Dazu wurden 200 µl der LiAc-kompetenten Hefezellen und 1,2 ml wiederum frisch zubereitete PEG-Lösung gegeben.

Die Zellen wurden nun für 30 min bei 30°C geschüttelt, 15 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und 5 s bei RT zentrifugiert. Am Ende der Prozedur wurden die Hefezellen in 200 µl 1x TE-Puffer aufgenommen, auf die vorbereiteten Selektionsplatten ausgebracht und bei 30°C im Inkubator kultiviert bis sich Kolonien zeigten. Dies konnte 2 bis 7 Tage dauern. Die Kolonien wurden nun ausgewertet oder mit der gleichen Prozedur für eine weitere Transformation vorbereitet.

3.2.9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es wurde der Expand High Fidelity PCR Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Hierzu wurden verschiedene Lösungsmischungen angefertigt:

Mix 1:

dNTPs (1.25 mM Stocklösung)	16 µl	oder	8 µl
5' Primer „Tat/Rev S“ (20 µM)	1 µl		0,5 µl
3' Primer (20 µM)	1 µl		0,5 µl
A.d.	ad		50 µl
			25 µl

Mix 2:

10x PCR-Puffer (+MgCl ₂)	10 µl		5 µl
Enzym Mix	0.75 µl		0,4 µl
A.d.	ad		50 µl
			25µl

Zyklusbedingungen:

4 min	94°C	}	25-35 Zyklen
1 min	94°C		
1 min	52-72°C		
30 s-6 min	72°C		
7 min	72°C		

dann Abkühlen und Lagern auf 4°C.

Reaktionszeiten und Temperaturen wurden der zu amplifizierenden DNA und der beiden verwendeten Primern spezifisch angepasst. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler Perkin Elmer Cetus GeneAmp9600 oder 2400 unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt.

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf TAE-Agarose Gelen aufgetrennt, durch EtBr und UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Banden der richtigen Größe wurden aus den Gelen ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem „Nucleospin PCR Purification Kit“ von Macherey-Nagel, Düren gereinigt. Die Reinigung lief in großen Teilen identisch zur Aufreinigung von DNA aus Agarose Gelen ab, nur dass die PCR-Reaktion direkt in einer vierfachen Volumenmenge Puffer NT2 aufgenommen und dann direkt auf die Säulen geladen wird. Die so gereinigte DNA konnte in verschiedene PCR-Klonierungsvektoren kloniert werden (s.u.) und so für Sequenzierungsreaktionen oder weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

3.2.9.4 Klonierung von PCR Fragmenten

Bei dem „TOPO-TA Kloning Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) liegt der Klonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® linearisiert mit einzelnen 3'-Tymin (T) überhängenden Enden vor. Das Enzym Topoisomerase I ist kovalent an diese Enden gebunden und stabilisiert sie. Die Taq-Polymerase besitzt die Aktivität einer Terminaltransferase, unabhängig von der DNA-Matrize, welche ein Adenosin (A) an das 3' Ende des PCR-Produktes anfügt. Der Expand® HighFidelity PCR-Kit von Roche enthält die Taq Polymerase.

Ausgenutzt wird nun die Ligaseaktivität der Topoisomerase, die zu einer effizienten Ligation der einzelnen überhängenden T und A Nukleotide führt. Ein Überblick ist in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

Reaktionsprotokoll:

0,5-4,0 µl	PCR Reaktion (mit ca. 10-100 ng DNA)
1 µl	Salzlösung
ad 5,0 µl	A.d.
1 µl	pCR2.1-TOPO Vektor
vorsichtig mischen, 5-30 min bei RT inkubieren	

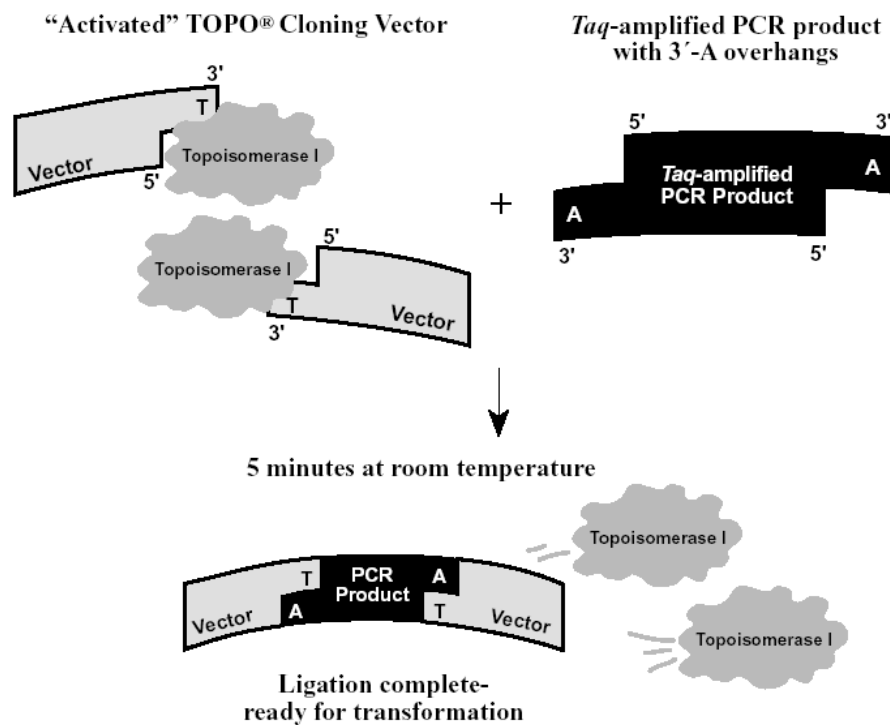


Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung der TOPO-TA PCR-Klonierung (entnommen dem Herstellerprotokoll, Invitrogen, Karlsruhe).

Danach erfolgte eine Transformation in TOP10F⁺ chemisch kompetente E. Coli (Invitrogen, Karlsruhe). Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Positive Klone konnten dadurch ermittelt werden, da das PCR Produkt in den Leserahmen des *lacZ*-Gens inseriert wird, diesen unterbricht und dadurch weiße anstatt blaue Kolonien auf X-Gal/IPTG LB-Agarplatten wachsen. Genauere Untersuchungen der inserierten DNA konnten durch PCR bzw. Sequenzierungen mittels beidseitig der Inserierungsstelle liegenden M13forward/reverse Primern durchgeführt werden. PCR-Produkte die zu weiteren Klonierungsschritten benötigt wurden, wurden obligatorisch auf die korrekte Sequenz durch Sequenzierung überprüft.

Als Alternative zu der TOPO-TA Klonierung wurde speziell für die PCR-Klonierung von KIAA0592 ein zweites System zu Hilfe genommen. Der PCR Script Amp Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) basiert auf einer kombinierten und entgegengesetzten Ligations- bzw. Restriktionsreaktion (Enzym SrfI) des Vektors. Dabei werden PCR-Fragmente (ohne zusätzliches Adenin) direkt in einen mit SrfI „blunt-end“, d.h. ohne überhängende Enden linearisierten pPCR-Script Vektor ligiert. Zusätzlich liegt in der Reaktion das Enzym SrfI mit der seltenen 8-Basen Schnittsequenz selbst mit vor und

dadurch wird religierter Vektor ohne Insert sofort wieder geschnitten. Eine Veranschaulichung ist in Abbildung 3.2.2 gezeigt.

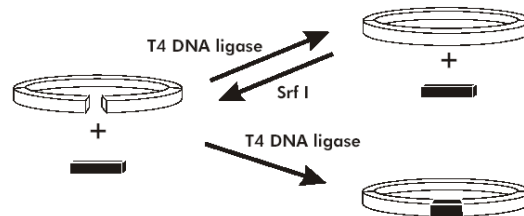


Abbildung 3.2.2: Schematische Darstellung der PCR-Script Klonierungsmethode (entnommen dem Herstellerprotokoll, Stratagene, Amsterdam, NL).

3.2.9.5 Sequenzierung

Das Grundprinzip dieser Sequenzanalyse ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen, and Coulson, 1977). Für die Sequenzreaktion wurde klonierte, gereinigte DNA verwendet, da Proteinbestandteile oder Primer sowie Ethanolreste die Sequenzreaktion stören würden. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten im Auftrag durchgeführt.

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 Proteinbestimmung mit Bicinchioninsäure (BCA)

Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte aus dem Überstand von Zelllysaten nach einer kolorimetrischen Methode. Verwendet wurde der BCA-Protein-Assay von Pierce. Dieser Test beruht auf der Umsetzung von Cu^{2+} in Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu (Redinbaugh and Turley, 1986; Smith et al., 1985). Die Reduktion ist mit einer Farbreaktion gekoppelt (Biuret-Reaktion). Die Kupferionen bilden einen Chelatkomplex mit Bicinchoninsäure (BCA) in der Lösung und die Komplexe absorbieren Licht der Wellenlänge 562 nm. Die Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration, der Messbereich liegt zwischen 20 und 2000 μg Protein pro ml. Der Test wurde mit einem Probenvolumen von 20 μl in 96-Loch-Mikrotiterplatten angesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Eichkurve mit BSA bekannter Konzentration (Stocklösung: BSA 2mg/ml). Für alle Proben wurden

Doppelbestimmungen pipettiert. Der BCA-Proteintest besaß eine hohe Sensitivität und war tolerant gegenüber verschiedenen Triton-X100 Konzentrationen und Lysepuffer. Für die Eichkurve wurde die BSA Stocklösung auf Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 1,8 mg/ml verdünnt. Als Leerwert diente Aqua destillata. Von jeder Verdünnung wurden 10 µl pro Loch der Mikrotiterplatte eingesetzt. Dazu wurde 5 µl A.d. und 5 µl des für den Proteinextrakt verwendeten Lysepuffers gegeben. So konnte sichergestellt werden, dass auch in den Standardlösungen die gleiche Menge an Lysepuffer wie in den Proteinproben vorlag und die Messung konnte unter gleichen Voraussetzungen stattfinden. Von den Zelllysaten wurden 2,5- 5 µl pro Loch eingesetzt und mit A.d. auf 15 µl aufgefüllt. Vor allem bei der Zelllinie HEK293 ergaben sich zu hohe Konzentrationen und die Probe musste stärker verdünnt eingesetzt werden. Das entstandene Verhältnis zwischen Probe und Standard wurde später bei der Auswertung wieder mit einbezogen. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Zu jeder Probe wurden 200 µl der Mischung (A+B) pipettiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die OD_{570nm} im Spektralphotometer gemessen. Die zur Auswertung nötige Eichkurve und der Vergleich mit den einzelnen Messwerten wurde durch das Photometer von Biorad selbstständig erstellt. Danach wurden Werte von Doppelmessungen miteinander verglichen und die Konzentrationen anhand der Verdünnungen im Vergleich mit dem Standard errechnet.

Lösung A:

Na ₂ SO ₄	8.55 g
NaOH	2.00 g
Natriumtartrat	0.80 g
NaHCO ₃	4.75 g
BCA-Na ₂	5.00 g
A.d.	ad 500 ml
pH11.25 mit NaOH	

Lösung B:

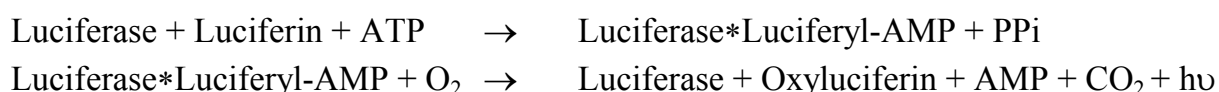
CuSO ₄	2.00 g
A.d.	ad 50 ml

3.3.2 Luciferase-Aktivitätsmessungen

Der „Luciferase Assay“ von Promega diente zur quantitativen Bestimmung der „Firefly“ Luciferase (ursprünglich isoliert aus *Photinus pyralis*) in Zelllysaten. Dazu wurden die Zellen 24-48h nach der Transfektion geerntet, in 100-200 µl 1x Zellkultur Lyse Reagenz von Promega aufgenommen und bei RT 20 min unter leichtem schütteln inkubiert. Die Aktivität der Luciferase konnte im Zelllysate nachgewiesen werden. Für den Nachweis wurde jeweils 5-50 µl Menge an Lysat je nach Zelllinie und Transfektionseffizienz herangenommen. Dieses Volumen wurde in weiße 96-Lochplatten von NUNC pipettiert. In einem Luminometer ORION™ von Berthold

wurden automatisch 100 µl des rekonstituierten Luciferase Substrates (s.u.) hinzu pipettiert und der Umsatz an Substrat durch die Luciferase bestimmt. Der Substratumsatz erfolgt unter Emission von Licht. Die Lichtemission wurde in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) in einem bestimmten Zeitintergral (10 s) gemessen und auf 1,0 mg Gesamtprotein standardisiert.

Das Prinzip der Reaktion, die von de Wet erstmals beschrieben wurde (de Wet et al., 1987), beruht auf der Oxidation von Luciferin mit Hilfe von Energie unter Freisetzung von Lichtquanten. Folgende Reaktionen werden durch die Luciferase katalysiert:



3.3.2.1 Promotoranalyse durch Luciferaseexpression

Der Vektor pBL wurde spezifisch zur Analyse von Promotorsequenzen konstruiert und enthält die kodierende Sequenz des „Firefly“-Luciferasegens ohne eine vorgeschaltete regulatorische Sequenz. Vor diese Luciferasesequenz konnten nun die Sequenzen inseriert werden, welche auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription hin untersucht werden sollten. Die pBL-Vektoren mit den Sequenzstücken in Gegenstrangorientierung wurden als Negativkontrollen verwendet.

Da einzelne Promotoren (keine Enhancer) nur in einer bestimmten Orientierung funktionsfähig sind, konnte davon ausgegangen werden, dass die umgekehrten Fragmente nicht aktiv sind und es konnten somit Plasmide gleicher Größe in den Experimenten verglichen werden. Die Basisaktivität wurde anhand des pBL-Leervektors ermittelt. Dazu wurden aufsteigende Mengen (0,125µg bis 4 µg pro Loch einer 6-Lochplatte) des Plasmids in U87 MG Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und die Expression der Luciferase sowie die Gesamtproteinmenge pro Zelllysate bestimmt. Die Aktivität eines Promotors wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Promotoraktivität} = \frac{\text{Relative Lichteinheiten (RLU)}}{\text{pro Sekunde} \times 1 \text{ mg Gesamtprotein}}$$

3.3.3 Hefe 2-Hybridsystem für Proteininteraktionen

Um die Interaktion zwischen HIV-1 Rev und dem neuen Interaktionspartner Risp näher zu untersuchen, wurde ein Hefe 2-Hybridsystem (Fields and Song, 1989;

Golemis et al., 1999; Gyuris et al., 1993) genutzt. Diese Methode stellt einen nützlichen und sensitiven Zugang zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen dar. Es benutzt die Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) als Testobjekt und die transkriptionelle Aktivierung eines Reportergens als Indikator. Ein 2-Hybridsystem nutzt den Vorteil des modularen Aufbaus von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren bestehen aus mindestens zwei räumlich getrennten funktionalen Domänen, eine, die DNA spezifisch bindet und eine andere, welche die Transkription eines Genes durch Rekrutierung der generellen Transkriptionsmaschinerie aktiviert. Dabei müssen die beiden Domänen nicht kovalent miteinander verbunden sein und Domänen verschiedener Faktoren können kombiniert werden. Das verwendete System wurde von Gyuris (Gyuris et al., 1993) entwickelt und besteht aus drei essentiellen Komponenten. Der Vektor pEG202 exprimiert Fusionsprodukte der DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Transkriptionsaktivators LexA mit Rev und verschiedenen Rev-Mutanten. Das Plasmid pJG4-6 exprimiert Fusionskonstrukte der Aktivierungsdomäne des bakteriellen Transkriptionsfaktors B42 mit Risp und einer zusätzlichen SV40 NLS-Domäne. Das Testsystem ist der Hefestamm EGY48, der zwei Reportergene exprimiert. Ein Reporter ist das LEU2-Gen bei dem die regulatorischen Sequenzen durch LexA-Bindungsstellen ersetzt wurden und der in das Hefechromosom integriert wurde. Dadurch lässt sich nach Wachstum auf Leucin defizienten Nährplatten selektieren. Der zweite Reporter wird von dem Plasmid pJK103 exprimiert. Es handelt sich um das bakterielle *lacZ*-Gen bei dem ein Teil des Gal1 Promotors durch LexA-Bindungssequenzen ersetzt wurde. Dadurch lassen sich die Hefekolonien durch ihre bläuliche Farbe auf X-Gal-Medium detektieren. Jedes der Plasmide enthält noch ein Gen, das die Hefe zu Wachstum auf verschiedenen aminosäuredefizienten Medien befähigt. Die Plasmide mussten nacheinander transfiziert und unter Selektion gesetzt werden.

3.3.4 Checkmate™ Säuger 2-Hybridsystem für Proteininteraktionen

Bei dem Checkmate™ Säuger 2-Hybridsystem von Promega, Madison, USA wurde das oben beschriebene Hefesystem für Säugerzellen adaptiert. Der Vorteil gegenüber dem Hefe System besteht in der Untersuchung von Proteininteraktionen in menschliche Kulturzellen und Zelllinien, wohingegen die Hefe für menschliche Proteine ein artifizielles System darstellt. Die Basis ist wiederum der modulare Aufbau mancher Transkriptionsfaktoren aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer separaten Transaktivierungsdomäne, welche in der Lage ist mit der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren.

Das Checkmate™ System besteht aus folgenden Komponenten:

- a) der Gal4-DNA-Bindungsdomäne kodiert auf dem pBIND-Plasmid stromaufwärts einer multiplen Klonierungsstelle.
- b) der VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus kodiert auf dem pACT-Plasmid wiederum stromaufwärts einer multiplen Klonierungsstelle.

Für die Untersuchung der Bindung von Risp an Rev oder Crm1/Exportin1 wurden jeweils beide Proteine in die Vektoren pBIND und pACT kloniert. Transfiziert man nun Zellen mit den pBIND- und pACT-Expressionsplasmiden und dem Reporterkonstrukt pG5*luc*, kann man durch anschließende Auswertung der Luciferase Aktivität die Interaktion über die Induktion der „Firefly“ Luciferase messen. Die Renilla Luciferase wird zusätzlich auf dem pBIND Plasmid kodiert und ermöglicht die Anwendung des Dual-Luciferasesystems. Als Positivkontrolle für die Interaktion zweier Proteine wurden von Promega die Plasmide pACT-MyoD und pBIND-Id mitgeliefert.

Die Transfektion wurde in HEK293-Zellen durchgeführt. Transfiziert mittels der CaPO₄-Kopräzipitationsmethode wurden jeweils 1 µg der Plasmide, welche für die Fusionsproteine kodieren und 2 µg des Reporterkonstruktes. Es wurden bei allen Experimenten folgende Kombinationen transfiziert:

- pACT und pBIND, um die Hintergrundexpression von pG5*luc* zu bestimmen
- pACT-Risp und pBIND-Rev, um die Interaktion zwischen Rev und Risp zu bestimmen
- pBIND-Risp und pACT-Crm1, um die Interaktion von Risp mit Crm1 zu bestimmen
- pACT-Rev und pBIND-Rev, als Kontrolle für eine Interaktion von Rev mit sich selbst
- pACT-Risp mit pBIND-Leervektor, um eine mögliche Bindung von Risp an die Gal4 DNA-Bindungsdomäne zu testen
- pACT-Leervektor mit pBIND-Rev, um eine mögliche Bindung von Rev an die VP16-Aktivierungsdomäne zu testen
- pACT-MyoD und pBIND-Id, als Kontrolle des experimentellen Systems

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Proteinkonzentrationen bestimmt und durch eine Luciferase-Messung die relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) ermittelt. Die erhaltenen Messwerte repräsentierten die Aktivität des Reportergens und ließen direkten Schluss auf die Interaktion der Fusionsproteine zu.

Die Messwerte wurden auf 1 mg Gesamtprotein, enthalten in dem Proteinextrakt, standardisiert (RLU/s×mg). Die Werte der Interaktionspartner wurden mit dem Wert der Negativkontrolle VP16 und Gal4 ohne weitere Fusionsdomänen verglichen und die Induktion als ein Vielfaches der Kontrollen dargestellt.

Die Induktion der Luciferaseexpression durch Aktivierung des Promotors in Folge einer Proteininteraktion wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Induktion} = \frac{\text{Interaktionspaar (Relative Lichteinheiten pro Sekunde pro mg Gesamtprotein)}}{\text{Leerkontrollen (Relative Lichteinheiten pro Sekunde pro mg Gesamtprotein)}}$$

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Methode wurde modifiziert nach Laemmli (Laemmli, 1970) übernommen. Mit der SDS-PAGE werden SDS-denaturierte Proteine entsprechend ihrer Größe in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das quervernetzte Polyacrylamid des Gels wirkt dabei als Molekularsieb. Durch Vergleich mit einem Längenstandard kann das Molekulargewicht der aufgetrennten Banden annähernd ermittelt werden.

3.3.5.1 Proteinisolation aus Zellkulturmaterial

Die in 60 mm Schälchen transfizierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit sterilem PBS gewaschen, je nach Zellzahl im vorliegenden Zellkulturgefäß mit einer bestimmten Menge 0.5fachem RIPA mit Proteaseinhibitoren (Kap. 2.2.2) behandelt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde das Lysat mit dem Zelldebris 15 min bei 4°C und 24000 g zentrifugiert. Aus den Überständen wurde mit einem an der Spitze gekrümmten Zahnstocher genomische DNA entfernt und der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Eine bestimmte Proteinmenge (10-50 µg) wurde mit 5-fachem Gelauftragspuffer versetzt. Nach Denaturierung der Proben und des Standards für 5 min bei 95°C wurden diese sofort auf das Gel aufgetragen.

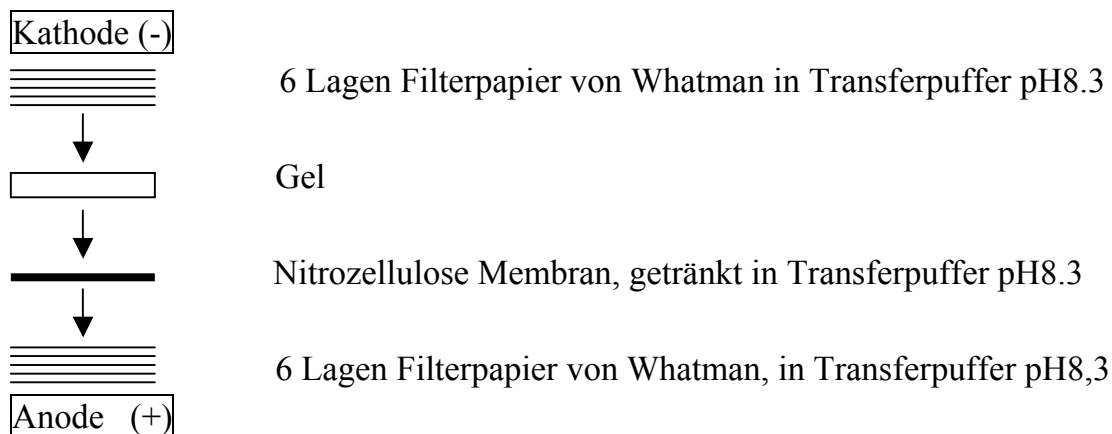
3.3.5.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte je nach zu untersuchender Proteingröße in 8 %igen bis 15 %igen SDS-Gelen oder 3-8 % und 4-12 % TrisAcetat-Gradientengelen von Invitrogen, Karlsruhe in vertikalen Gelkammern (Trenngelgröße 10 x 10 x 0.1 cm). Die Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel (s. Lämmli-

Protokoll bzw. Invitrogen-Protokoll). Der Gellauf erfolgte bei 60 V-120 V und einer konstanten Stromstärke von 10 mA/Gel. Das Pufferreservoir an Anode und Kathode war mit 1fach Elektrophorese Puffer gefüllt.

3.3.5.3 Western Blot

Für den Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) wurde das „Semi-dry-blotting“ Verfahren, modifiziert nach Khyse-Anderson (Khyse-Anderson, 1984), angewandt. Der Proteintransfer wurde wie folgt von der Anode zur Kathode aufgebaut:



Die Nitrozellulose (NC) Membran sowie die Whatman-Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Der Proteintransfer erfolgte 1.5 h bei 90 mA (ca. 0,8 mA/cm²).

Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die NC-Membran nach dem Proteintransfer ü/n in PBS-T-Puffer mit 10 % Milchpulver geblockt. Nach diesem Sättigungsschritt wurde die Membran einmal 5 min mit PBS-T-Puffer gewaschen. Der 1. Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100-1:5000 (je nach Herstellungsmethode und Herkunft) in PBS-T mit 1 % Milchpulver für 2 h bei RT inkubiert, anschließend die Membran 3x10 min mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation des peroxidasemarkierten 2. Antikörpers erfolgte in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS-T mit 1 % Milchpulver für 1 h. Nach erneuten Waschschritten (3x 20 min, in PBS-T) wurde die NC-Membran 1 min in ECL-Substrat von Amersham getränkt (0.125 ml/cm²) und luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt. Die Membran wurde für verschiedenen Zeiten auf einem Kodak-Film exponiert und anschließend entwickelt. Das ECL-System beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. Alternativ dazu konnten ECL-behandelte Membranen auch direkt am Chemidoc-

Geldokumentationssystem, Biorad dokumentiert werden, da dieses System über eine Kameravorrichtung verfügt, die empfindlich genug für Chemilumineszenz ist. Dies konnte allerdings nur bei einer bekannter oder zu erwartender relativ starker Lumineszenz, also starken Banden angewandt werden. Bei ersten Tests oder schwachen Banden musste auf den sensitiveren Film zurückgegriffen werden. Der Vorteil des Chemidoc besteht darin, dass die Daten sofort in digitaler und quantifizierbarer Form vorliegen.

3.3.6 Markierung von Peptiden mit Fluoreszenzfarbstoffen

Synthetische Peptide wurden von der Firma Sigma-Genosys, Pampisford, UK im Auftrag synthetisiert. Die Peptide wurden mit BSA konjugiert, das zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) markiert wurde. Zusätzlich wurde freies BSA hergestellt, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) markiert war. Die Markierungen und die Konjugation geschahen nach den Herstellerangaben.

3.4 RNA-Untersuchungen

3.4.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial

Um RNA aus Zellkulturmaterial zu isolieren wurden zwei Methoden angewandt. Für beide Methoden wurden ausschließlich autoklavierte Lösungen verwendet. Wässrige Lösungen wurden vor dem Autoklavieren mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) oder Dimethylpyrocarbonat (DMPC) behandelt (Sambrook, 1989). Es wurde sorgfältig darauf geachtet, Kontaminationen mit RNA-abbauenden Enzymen (RNasen) zu vermeiden. Grundsätzlich wurde mit zwei Paar Handschuhen übereinander gearbeitet, es wurden nur gebackene Glasgefäße oder neue RNase-freie Plastikware verwendet und alle weiteren verwendeten Geräte mit RNaseZap® regelmäßig gereinigt.

3.4.1.1 RNazol-Methode

Diese Methode wurde nach Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987) durchgeführt. 1×10^6 Zellen wurden direkt in den Zellkulturgefäßen mit 200 µl RNazol-B-Puffer lysiert und bei -20°C eingefroren. Das Zellpellet wurde nach dem Auftauen auf dem Vortexmischer suspendiert und mit 1/10 Volumen Chloroform versetzt. Nach einer Inkubation von 15min auf Eis wurde die Suspension erneut gemischt und zentrifugiert. Die dabei entstandene obere Phase enthielt die RNA, die durch Zugabe

von einem Volumen Isopropanol gefällt und nach einem Waschschriff mit 70 % EtOH in DEPC-Wasser aufgenommen wurde. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden Aliquots entnommen und 1:50 verdünnt.

3.4.1.2 RNA-Isolierung mit RNEasy Kit (Qiagen)

Als weitere Methode für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturmaterial wurde der RNEasy Kit von Qiagen verwendet. Die RNA-Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Verfahrens beruhte auf der Bindung der aus den Zellen freigesetzten RNA an im Kit enthaltene Säulen. Nach mehrmaligen Waschschriffen wurde die RNA mit RNase-freiem A.d. eluiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in 1:50 Verdünnungen bei einer Wellenlänge von 260/280 nm. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Ausbeute betrug 0,8-1,0 mg RNA pro 1×10^7 Zellen.

3.4.2 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die Untersuchung von zellulären Transkripten mit Hilfe der PCR erfordert die Umschreibung der RNA in cDNA. Dieser Schritt wird als reverse Transkription bezeichnet (Temin and Mizutani, 1970). Als Primer für die RNA-abhängige DNA-Synthese diente ein Gemisch synthetisierter Hexanukleotide zufälliger Sequenz, so dass eine gleichmäßig verteilte cDNA-Bank aus allen vorhandenen mRNA-Sequenzen entstand. Es wurden Hexamere als Primer verwendet, da oligo-desoxy-Thymidin Primer vorhandene mRNA nur vom 3' Ende aus umschreiben würde und so vermutlich lange Transkripte, wie KIAA0592 bei gleicher Reaktionszeit, statistisch weniger vertreten wären. Bei Hexameren die statistisch verteilt an mRNA binden, sollte die gesamte KIAA0592 mRNA in Form von überlappenden Teilstücken statistisch vertreten sein.

Für die Amplifikation von Risp oder KIAA0592-spezifischer Transkripte wurden 2-5 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 25 µl A.d. eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 100 µl. Eine RT-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 µl 10x AMV RT-Reaktionspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 16 µl dNTP-Mix (200 µM Endkonzentration jedes Nukleotids)
- 0,5 µl RNasin (40 U/µl, Promega, Madison, USA)
- 2,5 µl Hexanukleotidgemisch (1 mg/ml; Pharmacia, Freiburg)
- 1 µl AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl Roche Diagnostics, Mannheim)
- ad 75 µl. A.d.

Vor Zugabe des Enzyms und des RNase-Inhibitors (RNasin) wurde das Reaktionsgemisch für 10 min auf 68°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Reaktion wurde bei 45°C für 2 h inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und bei -80°C aufbewahrt.

Diese cDNA-Präparation konnte als Template für alle spezifischen Primerpaare verwendet werden. Tabelle 3.4.1 zeigt die Primerpaare zur Amplifikation von KIAA0592-Sequenzen. In einem zweiten Schritt wurden so die gewünschten Zielsequenzen mit genspezifischen Oligonukleotiden (s. Primern in Tab. 3.4.1) amplifiziert.

Primerpaar	Position in der KIAA0592-cDNA	Größe des Amplifikates	Amplifikation eines Fragment
RTPCR 1 RTPCR 2	314 bp - 904 bp	590 bp	5' Teil von KIAA0592
RTPCR 3 RTPCR 4	3416 - 3963	547 bp	3' Teil von KIAA0592
RTPCR Nagase 1 RTPCR Nagase 2	3763 - 3925	162	3' Teil von KIAA0592 entspr. Risp
PBGDmRNA s PBGDmRNA a	---	761	PCR2.1Topo-PBGD

Tabelle 3.4.1: Darstellung der genspezifischen Primerpaare, der genauen Position auf der isolierten cDNA-Sequenz, der exakten Größe des amplifizierten Bereiches und des Teilbereiches des Gens welches amplifiziert werden soll.

3.4.3 Northern Blot

Die Auftrennung der RNA erfolgte auf einen 1 % Agarosegel, mit leichten Veränderungen nach der Glyoxalmethode (Sambrook, 1989). Dazu wurden die RNA mit folgenden Komponenten vermischt:

- 10 µg RNA in 12.8 µl A.d./DEPC
- 0.4 µl 1M NaHPO₄ pH 7.2
- 20.0 µl DMSO
- 6.8 µl Glyoxal 40 %

Die Mixtur wurde 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und danach für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 10 µl 5x RNA-Auftragspuffer wurden die Proben auf das Agarosegel (1 %, in 10 mM NaHPO₄ pH7.2) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei 120 V über 4-5 Stunden. Als Laufpuffer wurde

ebenfalls 10 mM NaHPO₄ pH7.2 verwendet. Nach dem Gellauf wurde das Gel für 10 min in 20x SSC gebadet, die „Zeta probe GT“-Nylonmembran (Biorad) wurde zuerst zum Vorquellen in DMPC-Wasser eingeweicht und anschließend in 20x SSC äquilibriert. Die Übertragung der RNA auf die Membran erfolgte durch einen Kapillarblot. Dazu wurde die Gelkammer mit 20x SSC aufgefüllt und der Gelschlitten umgedreht in die Kammer eingesetzt. Darauf wurden sechs feuchte Whatman-Filterpapiere gelegt, deren Ende in den 20x SSC-Puffer ragte. Das Gel und die Membran wurden auf die Whatman-Papiere gelegt. Abschließend wurden noch zwei mit 20x SSC angefeuchtete und vier trockene Whatman-Papiere in Gelgröße, gefolgt von zwei Stapeln Papierhandtüchern, auf den Blot gelegt. Der gesamte Aufbau wurde durch einen Bleiring beschwert und die RNA über Nacht auf die Membran durch Kapillarkräfte geblottet. Am nächsten Tag wurde die RNA zunächst in einer UV-Kammer (UV-Crosslinking Chamber, Biorad) auf der Membran durch UV-Strahlung fixiert (4x Programm C1: Zeta Probe Damp), anschließend in Methylenblau in 0,3 M Natriumacetat gefärbt und photographiert. Nach dem Entfärben in 2x SSC (2-4x 500 ml) wurde die Membran durch 1 h backen bei 80°C noch einmal fixiert.

3.4.4 Herstellung radioaktiver Sonden

Radioaktive Sonden für die Bandendetektion in der Northern Hybridisierung wurden durch PCR in Anwesenheit eines radioaktiven dCTP hergestellt. Da die molare Konzentration von ³²P-markierten dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig) nur 6,7 µM/l beträgt, sollte die Konzentration der nichtradioaktiven Nukleotide soweit reduziert werden, dass bei Zugabe von 100 µCi α-³²P-dCTP ein molares Verhältnis von ca. 1:10 „heißem“ zu „kaltem“, d.h. radioaktivem zu nicht radioaktivem dCTP, erreicht werden konnte. Optimal war die folgende PCR-Reaktionszusammensetzung und -Profil (Rochlitz, 2000):

Mischung:

- 3,2 µl Mix aus dATP, dTTP, dGTP (je 0,125 mM/dNTP)
- 3,0 µl dCTP (0.125 mM)
- 5,0 µl α-³²P dCTP (6.7 µM)
- 2,0 µl Primer S (2 µM)
- 2,0 µl Primer AS (2 µM)
- 0,75 µl Roche Expand HighFidelity-Polymerase 5 U/µl
- 5,0 µl 10x Puffer mit MgCl₂ (25 mM)
- A.d. ad 25µl

PCR-Profil:

2 min 94°C	}	30 Zyklen
30 s 94°C		
1 min 55°C		
2 min 72°C		
10 min 72° C		
Abkühlen auf 4° C		

Um die Effizienz des Einbaus radioaktiven dCTP zu bestimmen wurde ein 1 µl Aliquot der PCR Reaktion abgenommen, die PCR Reaktion aufgereinigt, d.h. von nicht eingebauten Nukleotiden befreit und wiederum ein Aliquot abgenommen. In einem Szintillationszähler konnten diese Proben gemessen und ein Vergleich der Gesamtradioaktivität mit der Radioaktivität in den gereinigten PCR Fragmenten ergab die Inkorporation. Es wurden nur Sonden verwendet, bei denen nach der Aufreinigung noch eine Gesamtaktivität von 10^7 cpm in 50 µl vorlag.

3.4.5 Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden

Die Membran wurde in 20 ml ULTRAhyb-Hybridisierungspuffer (Ambion, Austin, USA) in einem Folienschlauch für 1 h bei 68°C im Wasserbad prähybridisiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen und die eigentliche Hybridisierung mit 10 ml ULTRAhyb, das die Sonde enthielt (10^6 cpm/ml), bei 42-50°C im Wasserbad über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 5 min mit 2x SSC/0,1 % SDS und zweimal 15 min mit 0,1x SSC/0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Zur Lagerung und weiteren Verwendung wurde der Blot in einen Folienschlauch eingeschweißt.

3.4.6 Detektion der markierten Banden

Zur Detektion der Banden wurde eine FUJI-Imageplatte mit dem radioaktiven Blot 2-12 h exponiert und dadurch aktiviert und danach die Aktivierung der Platte mit dem Storm860-PhosphoImager von Molecular Dynamics ausgelesen.

3.4.7 Entfernen („Strippen“) der hybridisierten Proben

Um die Membran mit einer anderen, zweiten Sonde hybridisieren zu können, wurde sie zweimal mit 500 ml 0,1x SSC / 0,5 % SDS bei 96°C 20 min lang inkubiert, was ein Ablösen und Abwaschen der gebundenen Probe bewirkt („Strippen“). Ob das Strippen erfolgreich war, wurde durch eine ü/n Exposition einer FUJI-Imageplatte kontrolliert.

3.5 Online Datenbanken und in silico Sequenzanalysen

Computergestützte (*in silico*) Sequenzanalysen von Proteinen und DNA-Sequenzen wurden online auf folgenden WorldWideWeb-Servern mit den angegebenen Programmen durchgeführt:

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Analysesoftware:

- *BLAST*: paarweise Sequenzvergleich, genomischer Sequenzvergleich
- *Pubmed*: Literatursuche

BCM (Baylor College of Medicine): <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>

Softwaresammlung:

- *TMpred*: Voraussage von Transmembrandomänen
- *PROSITE*: Voraussage von Proteinmodifikationsmotiven
- *Genscan*: Voraussage von Promotoren, TSS und Exon:Intron-Bereichen

Genomatix Software GmbH: <http://www.genomatix.de>

Analyseprogramme der GenomatixSuite:

- *Eldorado*: annotierter genomischer Sequenzvergleich und Kartierung
- *PromoterInspector*: Promotorvorhersage in genomischen Sequenzen
- *ModelInspector*: Identifikation von funktionalen Promotormodulen
- *MatInspector*: Detektion von Transkriptionsfaktorbindungsstellen
- *DiAlign*: multipler Sequenzvergleich
- *SMARTest*: Identifikation von S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Regions)

NPS@ (Network Protein Sequence @analysis): <http://npsa-bil.ibcp.fr>

Softwaresammlung:

- *SOPM*: Voraussage der Proteinstruktur
- *COILS*: Voraussage von „Coiled Coil“ Bereichen in Proteinen

UCSD (Universität von Kalifornien, San Diego): <http://meme.sdsc.edu>

Analysesoftware:

- *MEME*: Identifikation von homologen Proteinmotiven in Aminosäuresequenzen („Multiple Em for Motifs Elicitation“)

CBS (Technische Universität von Dänemark): <http://genome.cbs.dtu.dk/services>

Softwaresammlung:

- *Promotor 2.0*: Voraussage von Transkriptionsstartstellen (TSS)
- *ProtFun 1.1*: *ab initio* Vorhersage der Proteinfunktion

Alle benötigten Sequenzen wurden in das FASTA-Format umgewandelt und dann in die jeweiligen Such- und Vergleichsmaschinen geladen. Die Auswertungen wurden direkt online auf den genannten Seiten, mit herkömmlichen

Textverarbeitungsprogrammen oder dem GeneConstructionKit™ von Textco durchgeführt.

3.6 Statistik

Um festzustellen, ob sich zwei Datensätze signifikant unterscheiden, wurde ein Mann-Whitney Test herangezogen. Der Mann-Whitney Test (auch Rangsummentest) ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich unabhängiger Stichproben. Der dabei erhaltene zweiseitige p-Wert zeigt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich die zwei Stichproben zufällig unterscheiden könnten, obwohl die zugrundeliegenden Populationen gleich sind. Ein kleiner p-Wert bedeutet also, dass der Unterschied zwischen zwei Stichproben nicht zufällig, also signifikant ist, sagt jedoch nichts über die Größe des Unterschieds zwischen den Stichproben aus. Bei einem p-Wert größer als 0,05 spricht man von einem nicht signifikanten Unterschied zwischen den Stichproben. Der Test wurde durch die Graphpad Software Prism 2.0 für Mac oder 3.0 für Windows durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt der Arbeit war die Identifikation von Risp und die Erkenntnis, dass Risp dem C-terminalen Teil von KIAA0592 entspricht. Es stellten sich nun die Fragen, wie das komplette Protein aufgebaut ist, welche Eigenschaften es besitzt und wie das zugehörige Gen mit kodierenden und regulatorischen Bereichen aufgebaut ist.

4.1 „In silico“ Analysen der KIAA0592-Proteinsequenz

4.1.1 Vervollständigung der Aminosäuresequenz von KIAA0592

Da die KIAA0592-cDNA (AB011164) als 5' unvollständig vermerkt ist und damit Unklarheit über den Start der Transkription und der Translation vorlag, wurde ein Exon:Intron-Vergleich der cDNA mit dem bakteriellen artifiziellen Chromosom (BAC) RP11 324H6, welches einen Teil des humanen Chromosoms 10 widerspiegelt, durchgeführt (ExonMapper). Durch diesen DNA-Sequenzvergleich konnten 30 Exons vorausgesagt werden (Abb. 4.1.1).

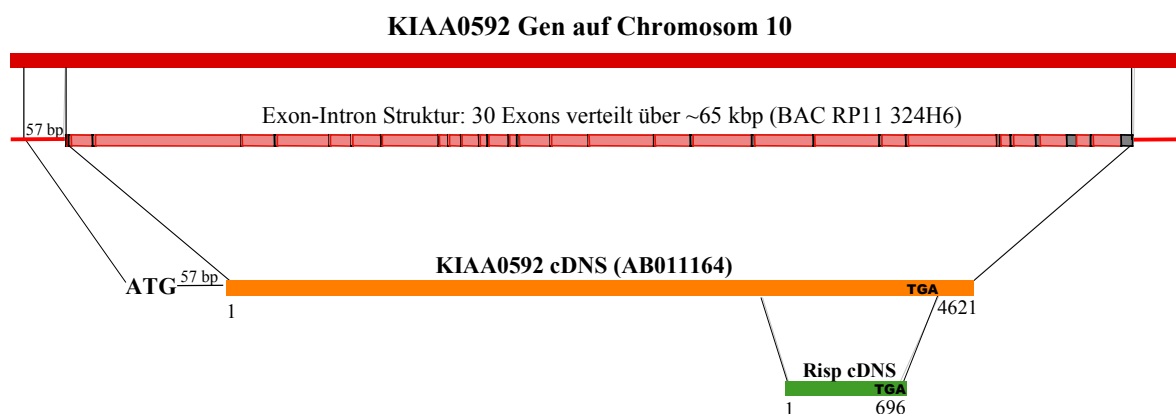


Abbildung 4.1.1: Zuordnung der im Hefe 2-Hybridsystem identifizierten Risp-Sequenz zu der beschriebenen KIAA0592-cDNA und der Sequenz eines Teils des menschlichen Chromosoms 10, der durch das BAC RP11 324H6 repräsentiert wird.

Durch eine Extrapolation der potenziellen kodierenden Sequenz von KIAA0592 um 57 Basenpaare (=19 weitere Aminosäuren) stromaufwärts wurde ein potenzielles ATG identifiziert, welches im Leserahmen von KIAA0592 liegt.

```

104839 ggt aga acc cca aac tcc agt ccc agt cca ctt ccg cag ctt cct ccc
104887 ctc agc ATG gca ggt cgg atc acg tgc ggg ttc tgt cac gtg aca tca
      104935 ggt cac gtg agg ccg gtc acg ccc cgg gca gct tgg ctg ggg cta ggc
      104983 ttc ccg ggc tct gca gtc ctc ggc gtg tgc tgg cag ctt ccg agc cca
      105031 ccg agc ccg ggc gct agg atg gtg agg ggc ccg ggc agg aga gag gcc
      105079 ggc ctg ggc tgg ggc cgc cgt ccc tgc cgc cct cag gct cag ctt ctc
      105127 ttc tcg ttt ttt tcg ctg cag atg aac ccg acg acc ccc gac cag gag
      105175 ctg ccg cca gcc tcg gag ccc gtg tgg gag ccg ccg tgg tcg gtg gag
      105223 gag atc cgc agg agc agc cag agc tgg tcg ctg gcg gcc gac gcg gcc
      105271 gtg aga ggc ggc ccc ccg gga cgc gag agc ggc agg ggt gac gct tgg
      105319 ctt gcg cgc agg agg gcc gga ccg cga ctg ccc ctg cac ctg gcc cgt
      105367 ccc gtt gcc tgc cct ctt agg aac aca cgc ccc gtt tag ccc ccg aga

```

Abbildung 4.1.2: Ausschnitt der Nukleotidsequenz des BAC RP11 324H6 mit Exon 1 und 2 (unterstrichen) von KIAA0592. Durch einen Vergleich der als unvollständig annotierten cDNA mit der Sequenz des BAC RP11 324H6 konnte ein möglicher Translationsstart (ATG, fett hervorgehoben) stromaufwärts identifiziert werden. Die Translation aller Codons in diesem Bereich passend zu dem Leserahmen von KIAA0592 ist dargestellt. Andere potenzielle Start- und Stoppcodons sind durch Rahmen markiert.

Abbildung 4.1.2 zeigt die ersten zwei Exons von KIAA0592 anhand der Sequenz des BAC RP11 324H6 (unterstrichen) und das ermittelte ATG-Startcodon (hervorgehoben) ebenfalls anhand eines Sequenzstückes des oben genannten BAC. Weiterhin zeigt die Abbildung die potenzielle Aminosäuresequenz beginnend mit dem ermittelten ATG bis zum ersten Stoppcodon in diesem Leserahmen, ohne auf Exon:Intron-Grenzen beschränkt zu sein. Die ersten drei Aminosäuren dieser Sequenz Methionin, Alanin und Glycin sind als stabilisierend für Proteine durch die Regel der N-terminalen Enden beschrieben (Buddecke, 1989; Varshavsky, 1996). Nur die unterstrichenen Bereiche (Exons) sind in der mRNA repräsentiert und kodieren für Aminosäuren. Es konnte kein weiteres ATG im Leserahmen stromaufwärts gefunden werden und es deutete nichts darauf hin, dass stromaufwärts noch ein weiteres Exon liegt. Jedoch liegen stromabwärts im Leserahmen, direkt an den Grenzen zwischen Exon eins und zwei, zwei weitere potenzielle Startcodons (Rahmen). Diese Codons liegen deutlich innerhalb der publizierten, potenziellen Proteinsequenz von KIAA0592

(BAA25518). Auffallend war außerdem, dass im ersten Intron (nicht unterstrichen, Abb.4.1.2) keine Stopsequenz im Leserahmen von KIAA0592 liegt. Falls kein Spleissen dieses Introns stattfinden würde, würde also der Leserahmen durchgehend vom ersten Methionin an translatiert werden, allerdings sind nur die unterstrichenen Bereiche durch cDNA repräsentiert, sodass nur diese Exons darstellen.

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen um die drei möglichen Startcodons mit der Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1984; Peri and Pandey, 2001) (Tab. 4.1.1) ergab, dass die Sequenz, welche das erste ATG-Codon (Position 104893 des BAC; Abb. 4.1.2) umgibt, die größte Ähnlichkeit damit zeigte. Sieben von neun Basen (unterstrichen) stimmen dabei mit der Kozak-Sequenz überein. Deswegen wurde diese um 57 bp oder 19 AS erweiterte KIAA0592komplett-Sequenz bei allen weiteren Sequenzvergleichen, ob Nukleotidsequenz oder Aminosäuresequenz, verwendet. Als Vereinfachung der Nomenklatur wurde als Namen hierfür KIAA0592komplett verwendet. KIAA0592komplett kodierende Plasmide sind nach der Klonierungsstrategie (s. Kapitel 2.5.1) mit 60KIAA0592 benannt.

Der Unterschied in der Sequenzlänge von KIAA0592komplett zu einem Protein, das von dem zweiten und dritten Startcodon translatiert wird, würde 52 bzw. 53 Aminosäuren ergeben mit einer Differenz im Molekulargewicht von ca. 5,5 kDa.

Kozak Konsensus	CC A/G CC <u>ATG</u> G
ATG an Pos.: 104893	<u>CT</u> <u>A</u> <u>GC</u> <u>ATG</u> <u>G</u>
ATG an Pos.: 105049	<u>TG</u> <u>A</u> <u>GG</u> <u>ATG</u> <u>A</u>
ATG an Pos.: 105148	<u>GG</u> <u>A</u> <u>TG</u> <u>ATG</u> <u>A</u>

Tabelle 4.1.1: Ein Sequenzvergleich der ersten drei möglichen ATG-Codons als Start des offenen Leserahmen von KIAA0592 in der annotierten Sequenz und in dem 5' vorausgehenden Bereich zeigte, dass das ATG-Codon 57 nt vor der annotierten KIAA0592-cDNA-Sequenz die beste Übereinstimmung (= unterstrichene Basen) mit der Kozak-Konsensussequenz bietet.

Dadurch ließ sich der Zusammenhang von Risp, dem KIAA0592-Protein und dem Chromosom 10 folgendermaßen vereinfachen: Risp entspricht dem C-terminalen Teil von KIAA0592 und das KIAA0592-Gen ließ sich anhand des BAC RP11 324H6 dem menschlichen Chromosom 10 zuweisen. Die publizierte KIAA0592-cDNA-Sequenz ist unvollständig. So bleibt die Lage des Transkriptionsstarts ungeklärt. Es gibt verschiedene potenzielle Anfangssequenzen zur Proteintranslation, aus denen sich ein Gesamtprotein von 148 kDa (KIAA0592komplett) oder 142,5 kDa errechnen lässt.

4.1.2 Homologe Proteine von KIAA0592 .

Zur Identifizierung von Proteinen, welche ähnlich oder identisch zur menschlichen KIAA0592-Proteinsequenz (BAA25518) oder dem KIAA0592komplett-Protein (BAA25518 + 19 AS) sind, wurden Sequenzvergleiche (BLAST) durchgeführt. Proteinsequenzhomologien können direkte Hinweise auf homologe oder ähnliche funktionale Einheiten zeigen.

4.1.2.1 Annotierte humane Proteinsequenzen

Zusätzlich zu der zur KIAA0592-cDNA gehörenden Proteinsequenz (BAA25518) sind in den Datenbanken weitere Proteine vermerkt, welche hohe Ähnlichkeit zu dem KIAA0592-Protein aufweisen. Einen Auszug aus der Suche nach homologen humanen Sequenzen gibt die folgende Liste (Tab. 4.1.2). Dabei werden nur Sequenzen gezeigt, deren Wertung anhand der Bewertungsmatrix BLOSUM62 hoch (Score>50) und deren Signifikanz hoch (E-Wert gegen 0) waren (BLAST). Das bedeutet dementsprechend eine große Identität und dass eine Zufälligkeit der Identität ausgeschlossen werden konnte.

<u>Homo sapiens</u> (Mensch)			
Proteinidentifikationsnummern (mRNA Nummern)	Proteinbezeichnung	Score	E-Wert
T00347 (keine mRNA)	hypoth. Protein DKFZp566G1246	<u>1859</u>	0.0
BAA91836.1 (AK001686)	unbenanntes Protein	<u>1070</u>	0.0
T12501 (keine mRNA)	hypoth. Protein DKFZp434O17	<u>729</u>	0.0
XP_170644.1 (XM_170644)	hypoth. Protein XP_17064...	<u>76</u>	4e-12

Tabelle 4.1.2: In den Datenbanken (nr) beschriebene menschliche Proteine (Accession Nummern), die durch einen Sequenzvergleich als ähnlich zu KIAA0592 identifiziert wurden. In Klammern angegeben ist die zugehörige mRNA oder wenn die Proteinsequenz direkt an die Datenbank übermittelt wurde (keine mRNA). Eine hohe Bewertung (Score) bzw. ein niedriger E-Wert zeigen eine hohe Identität (BLAST). Alle zugehörigen DNA-Sequenzen können auf Chromosome 10 gefunden werden.

Eine Sequenz mit exakter Übereinstimmung mit KIAA0592 besitzt das hypothetische Protein T00347 (DKFZp566G1246). Das bedeutet über die Gesamtlänge von 1353 Aminosäuren waren 100 % identisch. In der Datenbank wird direkt als Notiz auf die Übereinstimmung mit KIAA0592 hingewiesen. Das Protein BAA91836 (923 AS) ist zu 84 % identisch zu KIAA0592. Ein weiterer Klon T12501 (DKFZp434O171) besitzt eine ebenfalls hohe Sequenzidentität (86 %) mit KIAA0592, ist aber deutlich kürzer (491AS) und stellt wahrscheinlich eine unvollständige Sequenz dar. XP_170644 ist nur 91 AS lang und nur zu 62 % identisch. Alle aufgeführten ähnlichen Sequenzen

stellen unbenannte Proteine oder noch hypothetische Proteine dar, welche anhand von DNA-Sequenzen postuliert wurden und für die keine weiteren Funktionen oder Eigenschaften publiziert sind. Ein schematischer Vergleich der beschriebenen Proteine ist in Abbildung 4.1.3 dargestellt.

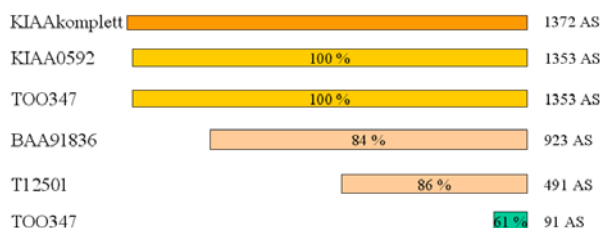


Abbildung 4.1.3: Schematischer Vergleich der als homolog zu KIAA0592 beschriebenen menschlichen Proteine. Angegeben ist die Aminosäurezahl der Proteine und die Identität zu KIAA0592komplett in Prozent.

Andere durch BLAST-Suchen identifizierte Proteinsequenzen haben nur geringe Identität (Score<50) mit KIAA0592 oder entsprechen vollständig Teilen der oben bereits aufgeführten Proteine und sind deshalb nicht im Einzelnen genannt. Diese weniger homologen Sequenzen werden in den Datenbanken als „ähnlich zu“ KIAA0592 oder den erwähnten Proteinen geführt. Der homologe Bereich beginnt bei dem längsten der ermittelten Proteine (T00347) mit der ersten Aminosäure der publizierten Protein-Sequenz, einem Valin, also keinem Methionin. Dieses Protein stimmt mit der publizierten KIAA0592-Sequenz (BAA25518) am N-terminalen Ende überein, mit KIAA0592komplett erst ab der Position 20. Dieses Valin liegt also 20 Positionen nach dem postulierten Start der Translation (Kap. 4.1.1) und 32 Positionen vor dem zweiten hypothetischen Methionin (ATG) von KIAA0592. Im Folgenden ist eine kurze Übersicht der Anfangsbereiche der möglichen KIAA0592-Proteine dargestellt. Die Proteine BAA91836 und T12501 sind kürzer und beginnen nicht mit dieser Sequenz:

```

AS:                1.....20.....52.....
KIAA0592komplett:  MAGRITCGFCHVTSGHVRPVTPRAAWLGLGFRGSAVLGLCWQPRSPPSRAGMMNRT.....
KIAA0592:                VTPRAAWLGLGFRGSAVLGLCWQPRSPPSRAGMMNRT.....
T00347:                VTPRAAWLGLGFRGSAVLGLCWQPRSPPSRAGMMNRT.....
  
```

Die Sequenzdaten des publizierten KIAA0592-Proteins stammen ausschließlich aus *in silico*-Translation. Nach Analyse der weiteren annotierten Proteine, welche ebenso auf *in silico*-Translationen beruhen, zusammen mit der möglicherweise vollständigen Sequenz von KIAA0592komplett sind nun mehrere Proteinsequenzen real möglich.

Diese potenziellen Proteine unterscheiden sich nur wenig am C-terminalen Ende. Es gibt keinen Beweis, dass die kurzen annotierten Transkripte vollständig sind und in Proteine (z.B. T12501, BAA81836) translatiert werden.

4.1.2.2 Homologe Proteinsequenzen in anderen Säugetieren

Die Suche nach vergleichbaren Proteinsequenzen ergab in den bisher bekannten Proteomen der Maus (*M. musculus*), des chinesischen Streifenhamsters (*C. griseus*) und in der Ratte (*R. norvegicus*) stark homologe Sequenzen vergleichbarer oder geringerer Länge. Ein Auszug des Ergebnisses des Protein-BLAST (NCBI) ist in Tabelle 4.1.3 dargestellt. Die Sequenz mit der größten Identität (57 % über 1347AS) von den Aminosäuresequenzen der Maus stellt das Protein NP_080861 dar. Andere Sequenzen wie BAC31648 oder BAB27436 sind kürzer und haben eine 70-80 %ige Identität mit NP_080861 und 50-65 % Identität mit KIAA0592. Für die erst kürzlich publizierte cDNA für das Protein NP_080861 (Januar 2003) liegen keine weiteren Informationen über Expression vor. Abschnitte sehr hoher Identität zwischen dem KIAA0592komplett und dem NP:080861 Protein (AS 54-173/1-109 =96 % und AS 174-248/126-195 =99 %) werden hierbei immer wieder durch Lücken unterbrochen. Dabei ergeben sich die Lücken der Konsensussequenz fast ausschließlich durch zusätzliche Bereiche in der Proteinsequenz der Maus.

Proteinidentifikationsnummern (mRNA Nummern)	Proteinbezeichnung	Score	E-Wert
<u>Cricetulus griseus</u> (Chinesischer Streifenhamster)			
AAK53434.1 (AF371373)	hypoth. Protein A1-3	<u>1125</u>	0.0
<u>Mus musculus</u> (Hausmaus)			
NP_080861.1 (NM_026585)	RIKEN cDNA C530005J20	<u>1085</u>	0.0
BAC31648.1 (AK043764)	unbenanntes Protein	<u>412</u>	2e-113
BAB27436.2 (AK011156)	unbenanntes Protein	<u>336</u>	2e-90
<u>Rattus norvegicus</u> (Wanderratte)			
XP_232289.1 (XM_2332289)	ähnlich Maus cDNA C530005J20	<u>341</u>	5e-92

Tabelle 4.1.3: In den Datenbanken (nr) beschriebene Säugetierproteine, welche durch einen Sequenzvergleich als ähnlich zu KIAA0592 identifiziert wurden. In Klammern angegeben ist die zugehörige mRNA. Eine hohe Bewertung (Score) bzw. ein niedriger E-Wert zeigen eine hohe Identität (BLAST).

Ein weiteres stark homologes Protein konnte in *C. griseus* gefunden werden. Hierbei liegen 59 % der Aminosäuren in einem Bereich von 1345 AS identisch vor. 68 % des Proteins sind außerdem zu dem oben beschriebenen Mausprotein identisch. Wiederum

ließen sich Bereiche sehr hoher Identität feststellen, welche durch Lücken unterbrochen werden. Die Lücken entstehen ebenfalls durch zusätzliche Aminosäuren in der Aminosäuresequenz des Hamsterproteins. In den publizierten Sequenzen der Ratte konnte ein kürzeres Protein (413 AS) ermittelt werden, welches ebenfalls zu 57 % identische Aminosäuren zu KIAA0592komplett aufweist. Die Sequenz stimmt hierbei im N-terminalen Teil von KIAA0592komplett überein. Dieses Protein ist direkt annotiert als ähnlich zu dem Mausprotein NP_080861 und stimmt in 69 % der Aminosäuren überein. Die Ergebnisse des BLAST-Proteinvergleichs sind in Tabelle 4.1.4 als Übersicht dargestellt.

zu KIAA0592komplett (1372AS)			Vergleichssequenz
Identische:	781 über 1347	(57 %)	M. musculus NP_080861 (1334 AS)
Positive:	858 über 1347	(62 %)	
Lücken:	41 über 1347	(3 %)	
Identische:	798 über 1345	(59 %)	C. griseus AAK53434 hypothetisches Protein A1-3 (1345 AS)
Positive:	869 über 1345	(64 %)	
Lücken:	54 über 1345	(4 %)	
Identische:	226 über 392	(57 %),	R. norvegicus XP_232289 (413 AS)
Positive:	238 über 392	(60 %),	
Lücken:	51 über 392	(13 %)	

Tabelle 4.1.4: Direkter Sequenzvergleich zwischen der menschlichen Sequenz und den Säugerspezies in denen Homologe zu KIAA0592 gefunden wurden (BLAST). Dargestellt sind reell und prozentual die identischen und positiven (=chem. konservierte) AS und der zuzuordnende Bereich in KIAA0592komplett (BAA25518 + 19 N-terminale AS).

4.1.2.3 Vergleichbarer Proteinaufbau in verschiedenen Säugerspezies

Sowohl die in den verfügbaren Datenbanken an Mausproteinen als auch an Hamsterproteinen ermittelten homologen Sequenzen stellen wie die menschlichen Sequenzen bisher unbenannte oder hypothetische Proteine dar. Nur anhand des Vergleichs der Aminosäuresequenzen Aussagen über Homologien zu treffen, ist nicht ausreichend, um zusammenhängende homologe Domänen einzugrenzen. Deshalb wurden die Proteine vergleichbarer Länge des Menschen, der Maus und des Hamsters nach konservierten Sequenzmotiven durchsucht. Eine Untersuchung durch das Programm MEME führte zur Identifizierung homologer Sequenzbereiche in den drei Proteinen. Eine schematische Darstellung hiervon gibt Abbildung 4.1.4.

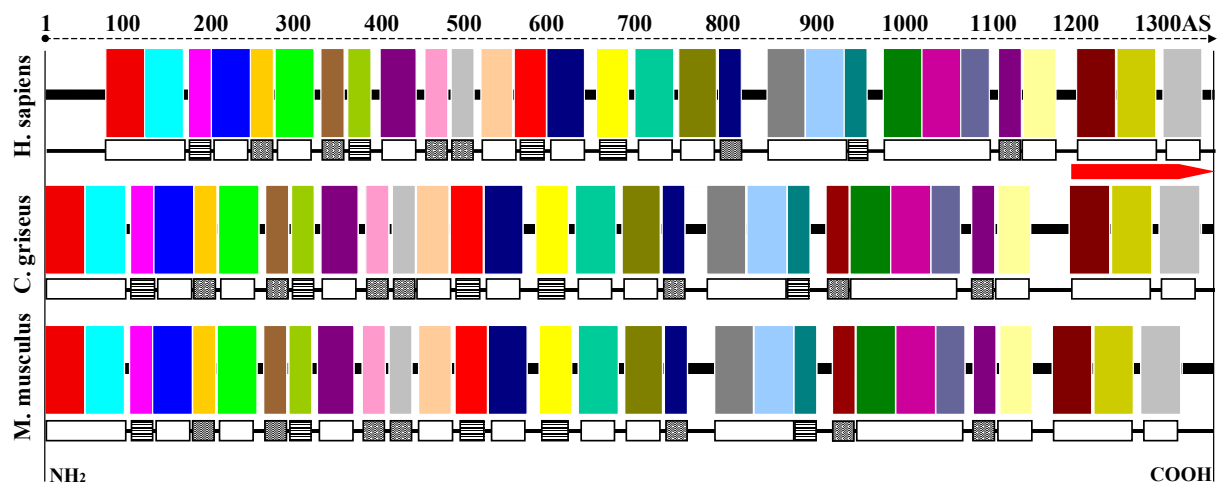


Abbildung 4.1.4: Grafische Darstellung konservierter Motive in Proteinen vergleichbarer Größe unterschiedlicher Spezies. Verglichen wurden das humane KIAA0592 (*H. sapiens*) und die entsprechenden Proteine des Streifenhamsters (*C. griseus*) und der Hausmaus (*M. musculus*) (s. Kap 4.1.4). Die farbigen Blöcke repräsentieren sich entsprechende Bereiche der Proteine. Der schwarze Balken darin markiert nicht zuzuordnende Bereiche. Die statistischen Signifikanzen der Ähnlichkeiten zwischen den jeweils gleich farbig markierten Bereichen sind in der unteren Blockreihe demonstriert. Dabei signalisieren weiße Blöcke eine Signifikanz von $E\text{-Wert} \leq e^{-10}$, gestreifte Blöcke von $E\text{-Wert} \leq e^{-5}$ und gepunktete Blöcke von $E\text{-Wert} \leq e^{-1}$. Die Abbildung wurde mit dem Programm MEME Version 3.0 erstellt und ist maßstabsgetreu zu den tatsächlichen Sequenzbereichen. Die Proteinsequenz von *C. griseus* zeigt 64 % positive AS zu KIAA0592, die von *M. musculus* 62 %. Der rote Pfeil repräsentiert den der Risp-Sequenz entsprechenden Abschnitt.

Ein Bereich besonderen Interesses ist der Abschnitt von KIAA0592, welcher der Risp-Proteinsequenz entspricht. Hierfür wurde ein lokaler Sequenzvergleich durch das Programm CLUSTAL X des C-Terminus zwischen den Spezies durchgeführt (Thompson et al., 1997). Der Vergleich ist detailliert in Abbildung 4.1.5 dargestellt. Die Sequenzidentität dieses Abschnittes liegt bei den Spezies zwischen 58 % und 64 %. Die Homologie in diesem Bereich entspricht der Homologie der Gesamtproteine. Auffallend ist, dass in dem Risp entsprechenden Bereich des Mausproteins NP_080861 (1335 AS) insgesamt 36 Aminosäuren am Ende des Proteins im Vergleich zu den beiden anderen Spezies fehlen. Führt man diesen Vergleich mit dem murinen Homolog XP_132786 (253 AS) durch, stellt man fest, dass in dieser Annotation, obgleich nur 253 Aminosäuren groß, diese 36 Positionen vorhanden und homolog zu den anderen Spezies sind. Diese 253 Aminosäuren würden exakt den dargestellten Bereich überspannen. Bis auf die fehlenden 36 Positionen sind NP_080861 und XP_132786 identisch.

Seq1 KIAA0592komplett <i>H. sapiens</i> (1372 AS)				
Seq2 NP_080861 <i>M. musculus</i> (1335 AS)				
Seq3 AAK53434 <i>C. griseus</i> (1317 AS)				
Sequ1	beginnend	1115	AASGEDSTEEALAAAAAPWEGGPVP-GVDTSPFAKSLGHSRGADLFDSGDIFSTGTGSQ	
Sequ2	beginnend	1118	MASGQTSSETATAP---PWEGGPVLSAADRSFFVKSRPQTGNEADLFDSGDIFPKSRGSQ	
Sequ3	beginnend	1061	MASGEISSEKAMAPAAPPWESGPALSAVDRSFFVASLPQTGNEADLFDSGDIFPKSIGSQ	
: *: * * *: *:.***. ..* * *. * :: .*****... ***				
Sequ1			SVERTKPKAKIAENPANPPVGGKAKSPMFALGEASSDDDLFQSAKPKPAKKTNPFFLLEDEDDLFTDQKVKKNET	
Sequ2			SVEGAG--VMAGEPPSHSSGGRKEKSLAFDLEGSSTEDLFQSVKPRAAKNRNPFPLLEDEEDLFADPRGKKNER	
Sequ3			SMEGTK--VKAETPAHLSSGGSKEKSLVFPALEASSTDDLFQTVKPRPAKKNRNPFFLLEDEDDLFAADRKGKKNEL	
*: * : . . * *: . * * * * * * . * . * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *				
Sequ1			KSSSQDVILTTQDIFEDDIFATEAIKPSQKTREKEKTLESNLFDDNIDIFADLTVKPKEKSKKKVEAKSIFDDDM	
Sequ2			KPDSDHSDSVSKTHDIFEDDIFATEAIKPFPPKKREKGRLEPNLFDDNIDIFADLT-----MFDDDT	
Sequ3			KSDSHQDIISKTDIFEDDIFATEAVKPFQKKREKERTLEPNLFDDNIDIFADLNVKPKEKSKKKVEAKSVFDDDT	
..: * * : . *: *				
Sequ1			DDIFSSGIQAKTTKPKRSRQAAPPEPRFEHKVSNIFDDPLNAFGGQ	1372
Sequ2			DDIFSSGL-----HKVASIFDDPLNAFGSQ	1335
Sequ3			DDIFSSGLQAKSKPKSQSAEATSELRSCHKVSNIFDDPLNAFGSQ	1317
*****: *				

Tabelle 4.1.5: Detaillierte Darstellung des C-terminalen Teils der Proteine im Vergleich zwischen der Maus, dem Hamster und dem Menschen. Im C-terminalen Teil liegt die ursprünglich im Hefe 2-Hybrid System als Rev interagierend identifizierte Proteinsequenz Risp (unterstrichen). In der Sequenz des Menschen besitzt diese ein potenzielles eigenes Startcodon (hervorgehobenes Methionin).

Im Proteom des Hamsters, der Maus und der Ratte konnten zu KIAA0592 identische oder ähnliche Proteine ermittelt werden, welche homologe Sequenzmotive teilen. Dies ist ein Indiz für ein phylogenetisch konserviertes Proteinprodukt.

Weitere Erkenntnisse über die Proteinfunktionen sind nötig um letztlich zu zeigen ob es sich um orthologe oder paraloge Proteinsequenzen handelt.

4.1.3 Sequenzeigenschaften des KIAA0592-Proteins

In der vorliegenden Aminosäuresequenz sind bereits alle Informationen, die für eine Struktur, Funktion oder Weiterverarbeitung des Proteins nötig sind, vorhanden. Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur werden direkt durch die Aminosäuresequenz ausgebildet und alle Signale zur Modifikation des Proteins sind auf dieser Ebene kodiert. Zur Analyse der Aminosäureabfolge auf Signale und Strukturbestandteile wurden verschiedene computer-basierende Methoden (Kap. 3.5) angewandt.

4.1.3.1 Struktureigenschaften des KIAA0592-Proteins: SOPM und COILS

Eine wichtige Eigenschaft eines Proteins ist die Sekundärstruktur, welche sich aus der räumlichen Anordnung nahe liegender Aminosäuren in der Peptidkette ergibt. Daraus entstehen verschiedene Strukturformen wie Helices oder Faltblattstrukturen. Abbildung 4.1.5 zeigt eine detaillierte Vorhersage der Strukturen für das

KIAA0592komplett-Protein durch die SOPM- („Self-optimized Prediction Method“) Proteinanalyse (Geourjon and Deleage, 1994; Geourjon and Deleage, 1995). Es zeigte sich, dass das Protein zu 34 % (467 AS, blau) aus α -Helices vor allem im N-terminalen Bereich und zu 13 % (66 AS, grün) aus β -Faltblattstrukturen besteht. Der restliche Bereich besteht zum großen Teil aus ungeordnet gewundenen („random coiled“) Bereichen (658 AS, gelb) und ausgedehnten („extended strand“) Strangabschnitten (181 AS, rot).

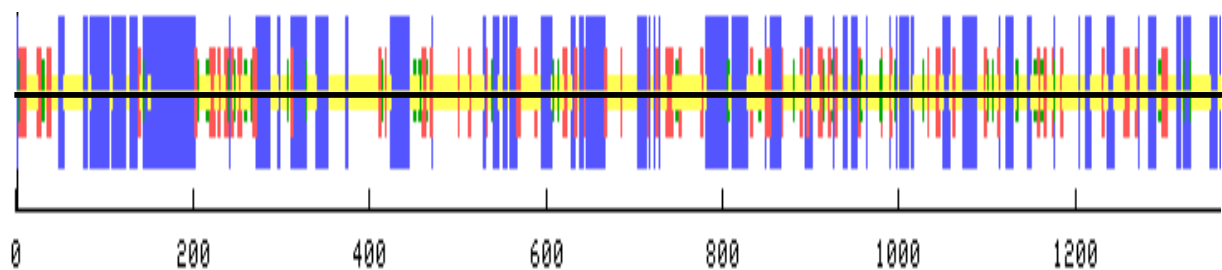


Abbildung 4.1.5: Berechnete Struktureigenschaften des KIAA0592komplett-Proteins (1372 AS). Die farbigen Bereiche zeigen potenzielle α -Helices (blau, zusammen 467 AS), ausgedehnte Strangabschnitte (rot, zusammen 181 AS), potenzielle β -Faltblattstrukturen (grün, zusammen 66 AS) und zufällig gewundene Regionen (gelb, zusammen 658 AS). Die Abbildung wurde mittels der SOPM Software erstellt (BCM Launcher).

Das KIAA0592komplett-Protein scheint die potenzielle Fähigkeit zu besitzen, in ausgedehnten Bereichen Sekundärstrukturen, vor allem α -Helices auszubilden.

Eine weitere Stufe der Strukturanalyse besteht in der Vorhersage von sogenannten „Coiled Coils“ durch das Programm COILS. Das sind α -helikale Strukturen in einer Aminosäuresequenz, die wiederum verdrillt sind und in sich Helices bilden. Diese besonderen Strukturen wurden vor allem in Strukturproteinen und Transkriptionsregulatoren nachgewiesen (Lupas, 1996). Für Proteinbereiche von KIAA0592komplett ergaben sich die in Abbildung 4.1.6 gezeigten Wahrscheinlichkeiten (y-Achse) einer „coiled coil“ Struktur. Die Farben zeigen die in dieser mathematischen Methode zur Analyse verwendeten Berechnungsfenster von 14, 21 und 28 AS. In diesen Fenstern wird die Wahrscheinlichkeit für jeden Aminosäurerest im Vergleich mit den umliegenden Sequenzen ermittelt, mit der diese Aminosäure ein Teil einer „Coiled Coil“ Struktur ist (Lupas, 1996). Das KIAA0592komplett-Protein enthält vor allem im N-terminalen Teil (AS ~150-300) und in der Mitte (AS ~800) des Proteins verschiedene Bereiche, welche mit erhöhter Wahrscheinlichkeit „Coiled Coil“-Strukturen ausbilden können.

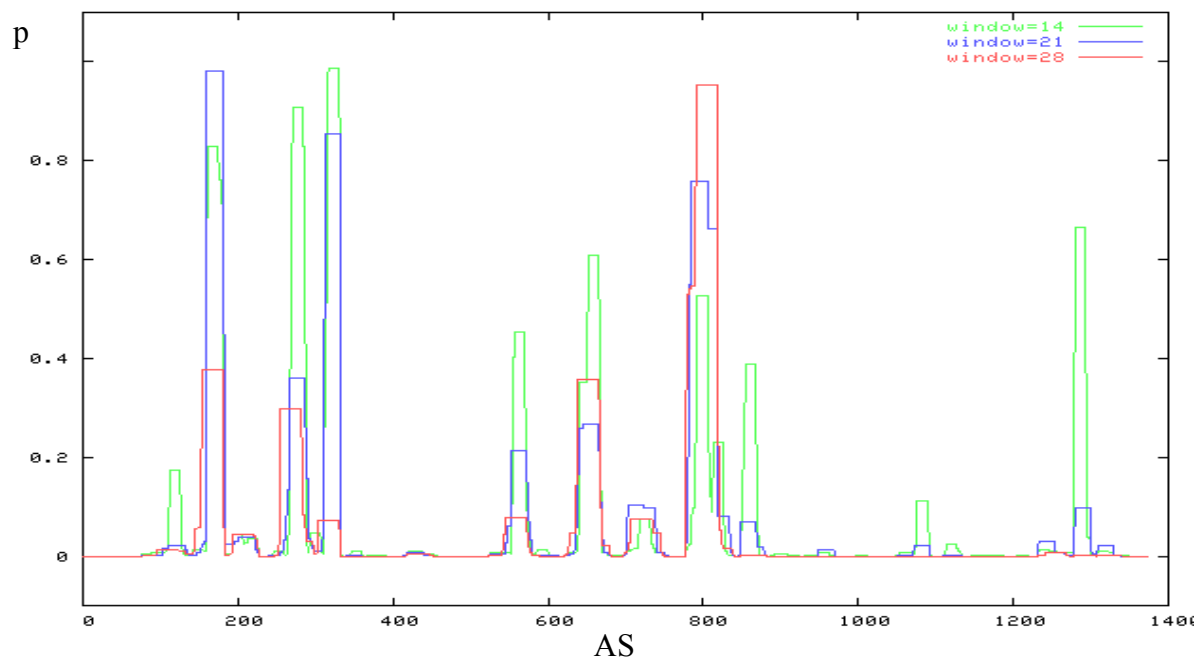


Abbildung 4.1.6: Voraussage ineinander gewundener α -Helixstrukturen („Coiled Coil“) in KIAA0952komplett. Die verschiedenen Farben geben die Fenstergrößen wieder in denen jede Aminosäure im Kontext der umliegenden auf die Wahrscheinlichkeit p (y-Achse) einer „Coiled Coil“ Struktur hin untersucht wird. Je höher die Wahrscheinlichkeiten in allen drei Analysefenstern eines Bereiches, desto höher ist die Möglichkeit einer „Coiled Coil“-Struktur.

4.1.3.2 Vorhersage möglicher Transmembranhelices: TMpred

Transmembranproteine haben spezielle Funktionen und dienen als Pumpen, Poren, Rezeptoren, Energieaustauscher und Enzyme. Durch das Programm TMpred konnte eine Voraussage über eine Transmembrandomäne in KIAA0592komplett mit einer signifikanten Wertung (>500) ermittelt werden (Hofmann, 1993). Die mögliche Domäne liegt zwischen den Aminosäuren 24 und 40, ist von außerhalb nach innerhalb einer Membran orientiert. Dieser Bereich wird von TMpred mit 982 Punkten als signifikant gewertet. Alternativ hierzu könnte die Aminosäuren 25 bis 41 auch entgegengesetzt orientiert eine Transmembrandomäne darstellen (791 Punkte). Ein fast identischer Bereich erreicht also statistisch signifikante Werte als Domäne, um in beiden Orientierungen in einer Membran verankert zu sein. Dieser Bereich liegt dabei am N-terminalen Ende des Proteins und ist nur in KIAA0592komplett vorhanden, da er im ersten Exon noch vor dem potenziellen zweiten Startcodon kodiert wird.

4.1.3.3 Signalsequenzen für posttranslationale Modifikationen: PROSITE

Proteine werden posttranslational modifiziert, wenn bestimmte Zielamino-säuren zur Verfügung stehen und bestimmte Muster in der Aminosäuresequenz vorliegen. Diese Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen sind essentiell für die Funktionseigenschaften oder Bindungsfähigkeiten von Proteinen. Durch die gesamte Sequenz von KIAA0592komplett konnte mit bestimmten Regeln und Mustern, welche in den Referenzdokumenten der PROSITE-Datenbank detailliert beschrieben sind, verschiedenste Proteinmodifikationssignale ermittelt werden (Falquet et al., 2002).

Potenzielle posttranslationale Modifikationsstellen in KIAA0592komplett	PROSITE Referenzdokument	Anzahl
N-Glykosylierung	PDOC00001 *	3
Tyrosine Sulfation	PDOC00003 *	1
cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierung	PDOC00004 *	6
Proteinkinase C Phosphorylierung	PDOC00005 *	28
Caseinkinase Phosphorylierung	PDOC00006 *	43
Tyrosinekinase Phosphorylierung	PDOC00007 *	1
N-Myristoylierung	PDOC00008 *	13
Amidation	PDOC00009 *	2
Häm-Bindungssignatur Cytochrome c Familie	PDOC00169	1
Glutamat-reiche Region	PDOC50099	1

Tabelle 4.1.6: Potenziell verwendete Sequenzen zur posttranslationalen Modifikation des KIAA0592komplett Proteins. Die Sequenzen sind durch Muster bzw. Regeln (Referenzdokumente s. Anhang) definiert und sind ausschließlich durch eine computergestützte Berechnung (PROSITE) ermittelt (Die mit * gekennzeichneten Muster/Regeln treten mit einer hohen Zufallswahrscheinlichkeit auf).

Das KIAA0592-Protein stellt ein großes zelluläres Protein mit errechneten 148 kDa Molekulargewicht dar, welches möglicherweise über verschiedenste Bereiche mit Sekundärstrukturen verfügt, eine mögliche Transmembrandomäne besitzt und eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen erfahren kann. Strukturen wie „Coiled Coil“-Helices konnten bisher in Proteinen verschiedenster Funktionsbereiche von fibrösen Strukturproteinen bis hin zu Transkriptionsfaktoren gezeigt werden und dienen häufig der Protein:Protein- oder Protein:DNA-Interaktion (Hach, Hon, and Zhang, 2000; Nusrat et al., 2000).

4.2 Genomische Organisation des KIAA0592-Gens

Die genomische Organisation ist essentiell, um Einsichten in phylogenetische Entwicklung, Kopienzahl und zelluläre Regulation zu erhalten. Sie stellt im Vergleich zu Proteinaufbau und mRNA/cDNA Sequenz den nächst höheren Grad der Komplexität des Aufbaus von genetischer Information dar. Der Chromosomenbereich und umliegende Gene wurden auf identifizierbare Zusammenhänge in Regulation und Funktion des KIAA0592-Gens analysiert.

4.2.1 Lokalisation und Anordnung des KIAA0592-Gens im menschlichen Genom

Es wurden Sequenzen in der vorläufig publizierten Zusammenstellung des menschlichen Genoms (Version Built 31) gesucht, welche der KIAA0592-cDNA entsprechen (EIDorado). Dabei wurden zwei chromosomale Bereiche für das Gen von KIAA0592 auf dem Chromosom 10 lokalisiert:

1. Die KIAA0592-cDNA kann auf das genomische Contig NT_035033 des Chromosoms 10 mit 97 % Ähnlichkeit kartiert werden.
2. Ein Bereich des Contigs NT_033898 des gleichen Chromosoms (10) hat 96 % Ähnlichkeit mit der KIAA0592-cDNA.

Die beiden Contig-Bereiche, auf die KIAA0592 lokalisiert, sind ca. 66 kbp groß. Durch einen direkten Sequenzvergleich dieser zwei Bereiche ließ sich feststellen, dass die unterschiedlich annotierten Contigs sich zu 98 % gleichen (DiAlign). Die Übereinstimmung der genomischen Sequenzen liegt in den Exon- genauso wie in den Intron-Bereichen der kartierten KIAA0592-Sequenz vor. Daraus ließ sich schließen, dass es sich um doppelt annotierte, identische Abschnitte des Chromosoms 10 handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem identifizierten Bereich des Contig NT_033898 gearbeitet, da sich hier ein größerer Ausschnitt (122 kbp) detailliert auf annotierte Sequenzen im Umfeld von KIAA0592 untersuchen ließ (Abb. 4.2.1).

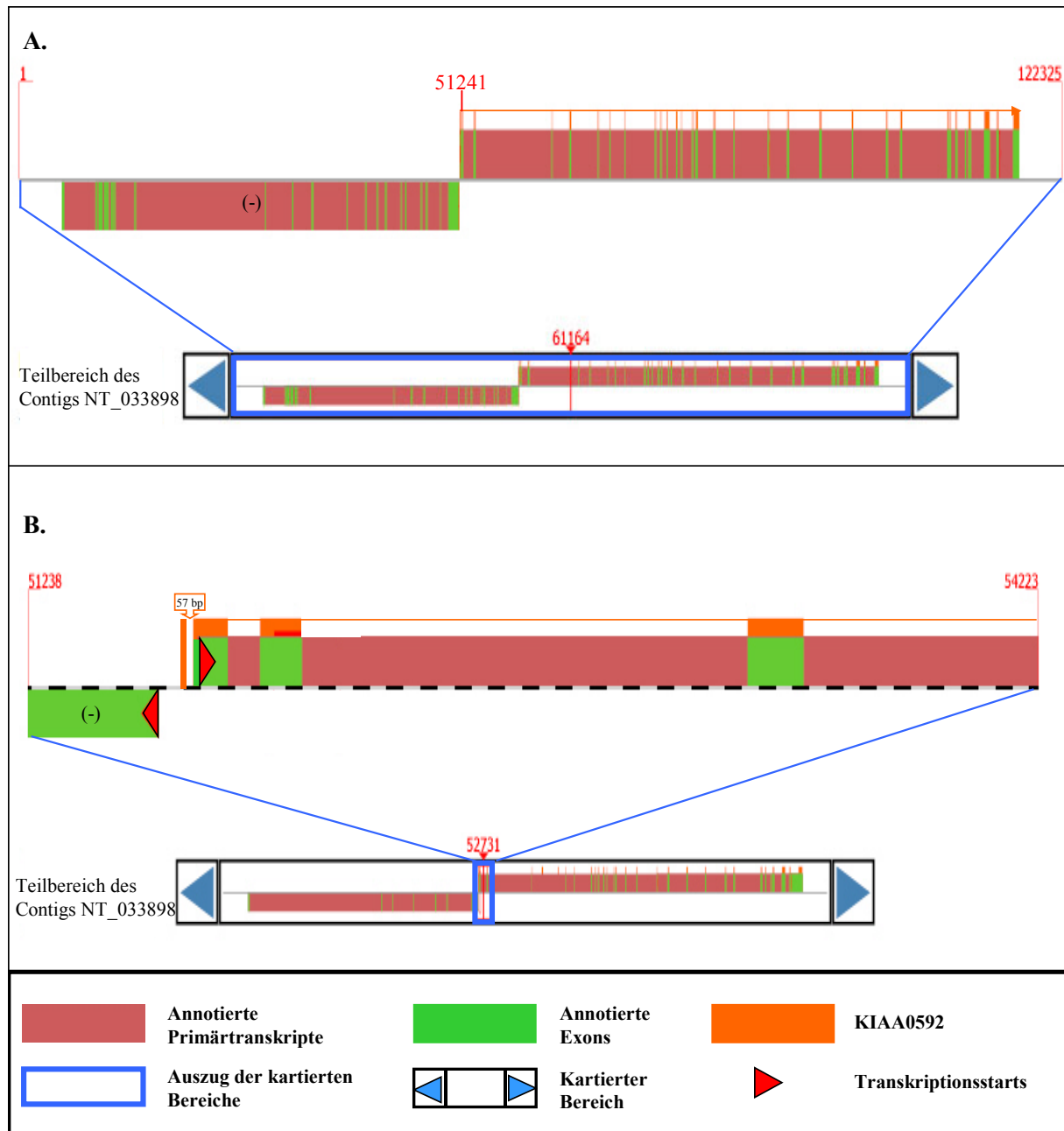


Abbildung 4.2.1: Kartierung der KIAA0592 cDNA (4623 bp) auf das menschliche Chromosom 10 (Contig NT_033898). Der in der Übersicht (A und B) dargestellte Teilbereich von NT_033898 ist 122,3 kbp groß und liegt zwischen den Basenpaaren 327097 und 449421 des Contigs.

A. Die Exons von KIAA0592 lassen sich auf einen 65,6 kbp großen Bereich des Fragments (orange) kartieren. Es besteht Übereinstimmung zwischen den Exons der KIAA0592-cDNA (orange) und den in diesem Bereich kartierten Exons der cDNA AK001686, XM_051956 und AK001545 (grün). Die 57 bp der neuen, potenziell längeren cDNA von KIAA0592komplett sind noch nicht in Übereinstimmung mit den annotierten Transkripten. Die primär transkribierten Bereiche sind dargestellt (braun). Direkt angrenzend an KIAA0592 sind in Gegenstrangorientierung (-) weitere Transkripte annotiert (AK056375, XM_171384). B. Detaillierte Kartierung des 5' Endes der KIAA0592-cDNA (orange) im räumlichen Vergleich zu den annotierten Exons (grün) und einem potenziellen Transkriptionsstart (rot) (Abbildung angelehnt an ElDorado, Genomatix).

Die detaillierte Kartierung der KIAA0592-cDNA (AB011164) ergab, dass sich die 30 Exons, die durch die BAC Sequenz vorausgesagt werden konnten, auf dem Plusstrang des Contigs über ca. 66 kbp erstrecken. Diese Exons stimmen komplett oder in Bereichen mit Exons von annotierten Transkripten überein. Drei Transkripte konnten der KIAA0592-Sequenz zugeordnet werden und sind in Tabelle 4.2.1 aufgelistet.

Im Umfeld der kartierten Sequenz liegen weitere Gene in negativer Strangorientierungen vor (- Strang). Eine Übersicht der Kartierung gibt Abbildung 4.2.1 A. Dargestellt sind jeweils die Annotationen der primären Transkripte (braun), deren Exons (grün), und im Vergleich die Kartierung der KIAA0592-cDNA Sequenz mit der die Suche durchgeführt wurde (orange). Der gesamte untersuchte Teilbereich ist in dem schwarzen Kasten repräsentiert, ein Ausschnitt (blau) wird jeweils detailliert dargestellt (ElDorado). Zwei der annotierten Sequenzen (XM_051956 und AK001686) sind nach Größe und Verteilung der Exons fast identisch. AK001545 überlappt weitestgehend im 3' Bereich mit der KIAA0592-Sequenz, ist aber ebenfalls separat beschrieben. Die in diesem Bereich annotierten Transkripte konnten den KIAA0592-homologen Proteinen zugeordnet werden (Tab. 4.1.2). Das Proteinprodukt von AK001686 konnte als Homolog zu KIAA0592 identifiziert werden, das Proteinprodukt von XM_051956 ist als ähnlich zu dem Protein DKFZp566G1246 beschrieben (NCBI). Auch das Proteinprodukt des kurzen beschriebenen Transkriptes AK001545 (Tab 4.2.1) ist direkt als ähnlich zu KIAA0592 beschrieben (NCBI).

Eine Übersicht der Annotationen und deren lokale Zusammenhänge gibt Tabelle 4.2.1. Wie in der Abbildung 4.2.1 wird dabei ein 122 kbp großes Fragment des chromosomalen Contigs NT_033898 beschrieben. Dementsprechend gelten Lokalisationen innerhalb dieses Fragments bezogen auf das erste Basenpaar des Fragments.

Transkriptnummer (Accession)	Orientierung	Lokalisation auf dem Fragment
AB011164 (KIAA0592)	+	51241-117321
XM_171384	-	8967-49422
AK056375	-	5001-51622
AK001686	+	51741-117321
XM_051956	+	51726-117321
AK001545	+	87948-116965

Tabelle 4.2.1: Nomenklatur und Lokalisation der Transkripte auf dem extrahierten Teilbereich des Contigs NT_033898 im Vergleich zu KIAA0592 (s. Abbildung 4.2.1 und 4.2.2). Der in den Abbildungen markierte Beginn der kartierten KIAA0592-cDNA ist rot hervorgehoben.

Zusätzlich zur Abfolge der genomischen Sequenzen ist auch die Position des Genbereiches im Chromatingerüst essentiell für die Aktivität. Sogenannte „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (S/MAR) koordinieren die Expression von Genloci. Die Bindung eines genomischen Segmentes an die Kernmatrix platziert Gene in die räumliche Nähe ihrer Transkriptionsfaktoren (Bode et al., 1995; Boulukas, 1995). Die Bereiche zwischen den Matrix-Bindungsstellen ragen dabei als Schleifen aus dem Chromatingerüst und sind frei zugänglich. Abbildung 4.2.2 zeigt solche S/MAR-Bereiche in der KIAA0592-Sequenz, welche durch das Programm SMARTest (Frisch et al., 2002) vorhergesagt wurden.

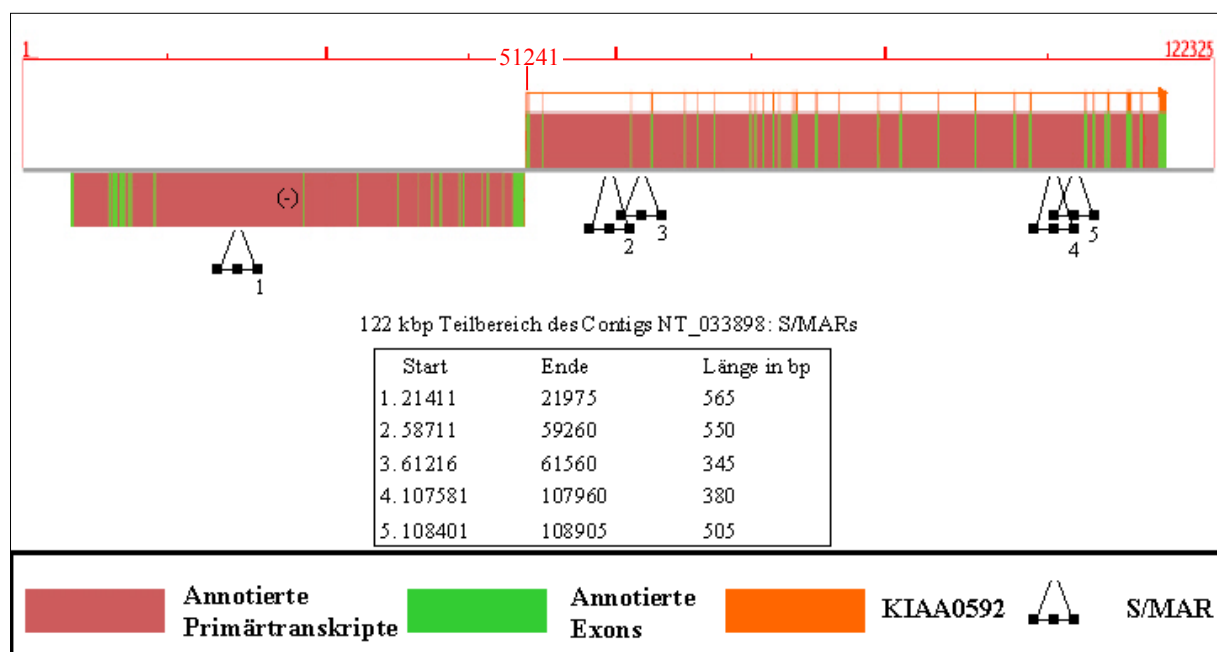


Abbildung 4.2.2: Die Bindungsregionen an die Chromosomenmatrix (S/MAR) des KIAA0592-Genbereiches des menschlichen Chromosoms 10 (Contig NT_033898). Eine Untersuchung des KIAA0592-enthaltenden genomischen Bereiches durch SMARTest auf S/MAR-Regionen (■-■-■) ergab fünf Bereiche, welche als Bindungsregionen möglich sind. Das in der Übersicht gezeigte Fragment von NT_033898 ist 122,3 kbp groß (zwischen den Basenpaaren 327097 und 449421 des Contigs). KIAA0592 kartiert mit seinen Exons auf einen 65,6 kbp großen Bereich des Fragments (orange). Dargestellt sind die KIAA0592-cDNA (AB011164, orange) und die Exons der in diesem Bereich annotierten Transkripte (AK001686, XM_051956 und AK001545, grün). Die primär transkribierten Bereiche sind braun dargestellt. Direkt angrenzend an KIAA0592 sind in Gegenstrangorientierung (-) weitere Transkripte (AK056375, XM_171384) annotiert. Die Liste zeigt die S/MAR-Bereiche nach Position und Größe geordnet. Zwei Bereiche mit jeweils zwei S/MARs befinden sich im Bereich des KIAA0592-Gens, ein SMAR genomisch angrenzend (Abbildung angelehnt an Eldorado, Genomatix).

Die ursprünglich im Hefe 2-Hybridsystem identifizierte Risp-cDNA Sequenz wurde ebenfalls auf das menschliche Genom kartiert (ELDorado) um zu analysieren, welchen Exon:Intron-Bereichen diese zugeordnet werden kann. Der Sequenzbereich wurde mit dem durch KIAA0592 identifizierten Bereich und den annotierten Sequenzen verglichen (Abbildung 4.2.3).

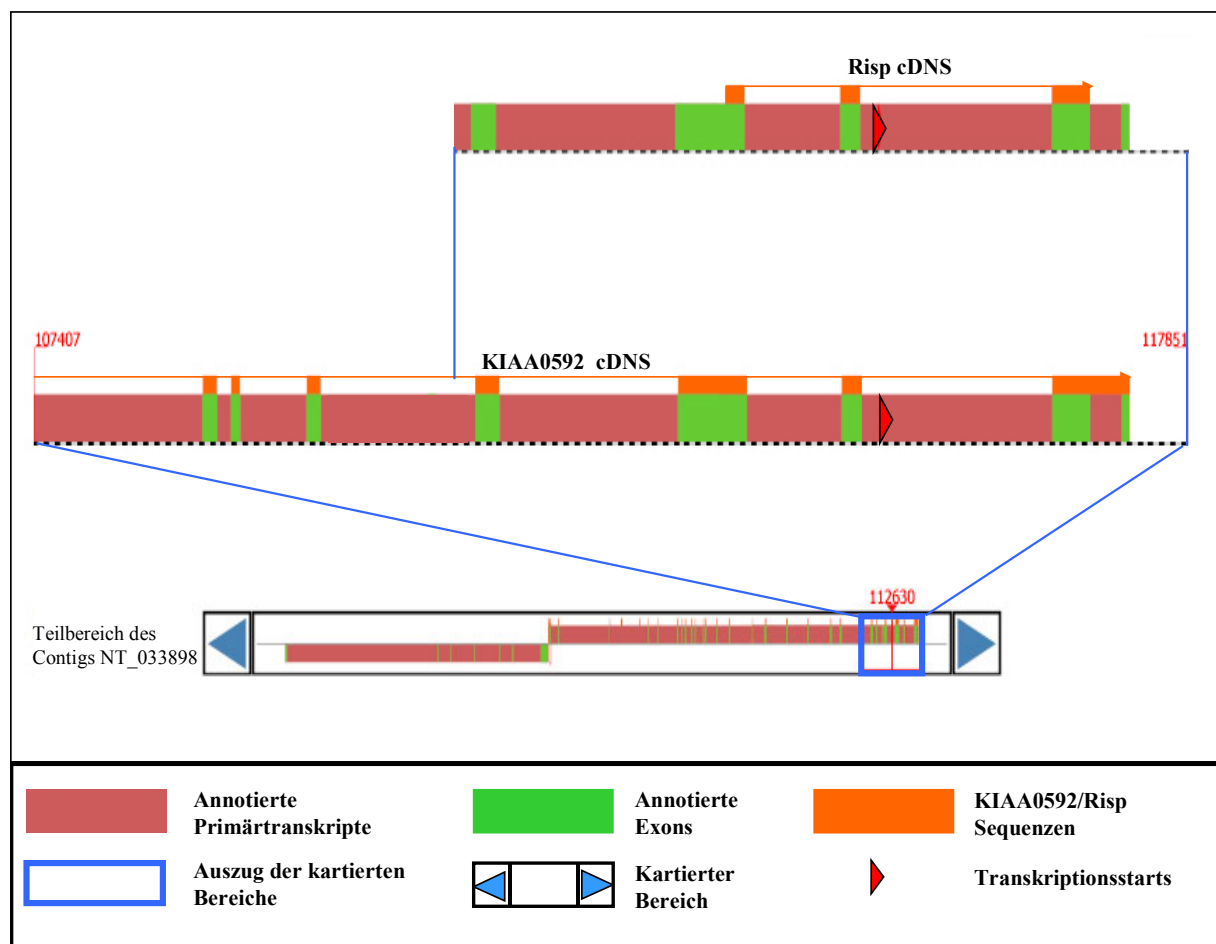


Abbildung 4.2.3: Kartierung der Risp cDNA (696 bp) auf das menschliche Chromosom 10 (Contig NT_033898) entsprechend der KIAA0592-cDNA. Der in der Übersicht gezeigte Teilbereich von NT_033898 ist 122,3 kbp groß und liegt zwischen den Basenpaaren 327097 und 449421 des Contigs. KIAA0592 kartiert mit seinen Exons auf einen 65,6 kbp, Risp auf einen 5 kbp großen Bereich des Fragments. Der primär transkribierte Bereich ist braun dargestellt. Es besteht Übereinstimmung zwischen Risp (orange), dem 3' Bereich der KIAA0592-cDNA (orange) und den Exons der annotierten Transkripte (grün; AK001686, XM_051956 und AK001545). (Abbildung angelehnt an ELDorado, Genomatix).

Es stellte sich heraus, dass Risp mit den Exons 27 bis 29 von KIAA0592 übereinstimmt. Das letzte durch die KIAA0592-cDNA kartierte Exon erstreckt sich im Gegensatz zu Risp über einen als Intron annotierten Bereich und ein weiteres Exon am

3' Ende. Die KIAA0592-Sequenz lässt ein großes zusammenhängendes Exon vermuten. Der Teil, welcher in der Risp-cDNA repräsentiert ist endet in diesem Exon. In der vorhandenen Risp-Sequenz ist ein Translationsstopp kodiert. Somit sollte es sich bei den letzten Exons von KIAA0592, welche sich nicht in der Risp-Sequenz widerspiegeln, um eine 3' untranslatierte Region (UTR) handeln.

Durch die Kartierung auf die Sequenzen des menschlichen Genoms lässt sich die Position und Organisation des KIAA0592-Gens eindeutig zeigen. In diesem Bereich sind keine Gene mit bekannter Funktion annotiert und KIAA0592 konnte bisher keinem funktionalen Gencluster zugeordnet werden.

4.2.2 Die Genomsequenzen der zu KIAA0592 homologen Gene in der Maus und in der Ratte

4.2.2.1 Kartierung auf das Chromosom 6 der Maus

Das murine Proteinhomolog zu KIAA0592 NP_080861 wird durch die cDNA NM_026585 kodiert.

Um die genomische Organisation der humanen KIAA0592-Genbereiche mit den entsprechenden Bereichen in der Maus zu vergleichen, wurde diese cDNA (4269 bp) auf das Mausgenom kartiert (Version: MGSCv3 Release 3; GenomeBLAST). Der genomische Bereich wird auf dem Chromosom 6 der Maus durch das Contig NW_000264 repräsentiert. Abbildung 4.2.4 stellt das detaillierte BLAST-Ergebnis anhand der übereinstimmenden Sequenzen (Blast Hits) dar.

Es wurden 29 Bereiche identifiziert, welche mit der cDNA übereinstimmen. Diese identischen DNA-Bereiche lassen auf die Exonstruktur des murinen Gens schließen. Der identifizierte Bereich erstreckt sich über ca. 55 kbp des Maus-Chromosoms (6). Somit ist die murine Sequenz vergleichbar mit dem zu KIAA0592 gehörenden menschlichen Chromosomenabschnitt (ca. 65 kbp, Tab.: 4.2.1 und Abb.: 4.2.1). Beide Genomteile sind ähnlich organisiert und besitzen eine vergleichbare Ausdehnung. Die von NCBI angebotene Homologiekartierung im Vergleich zwischen dem Menschen und der Maus muss insofern kontrolliert werden, da der Mausbereich, der dem zu KIAA0592 homologen Gen entspricht, hier auf Chromosom 14 lokalisiert wird. Eine direkte Suche im Genom der Maus liefert allerdings die hier gezeigten Daten des Chromosoms 6.

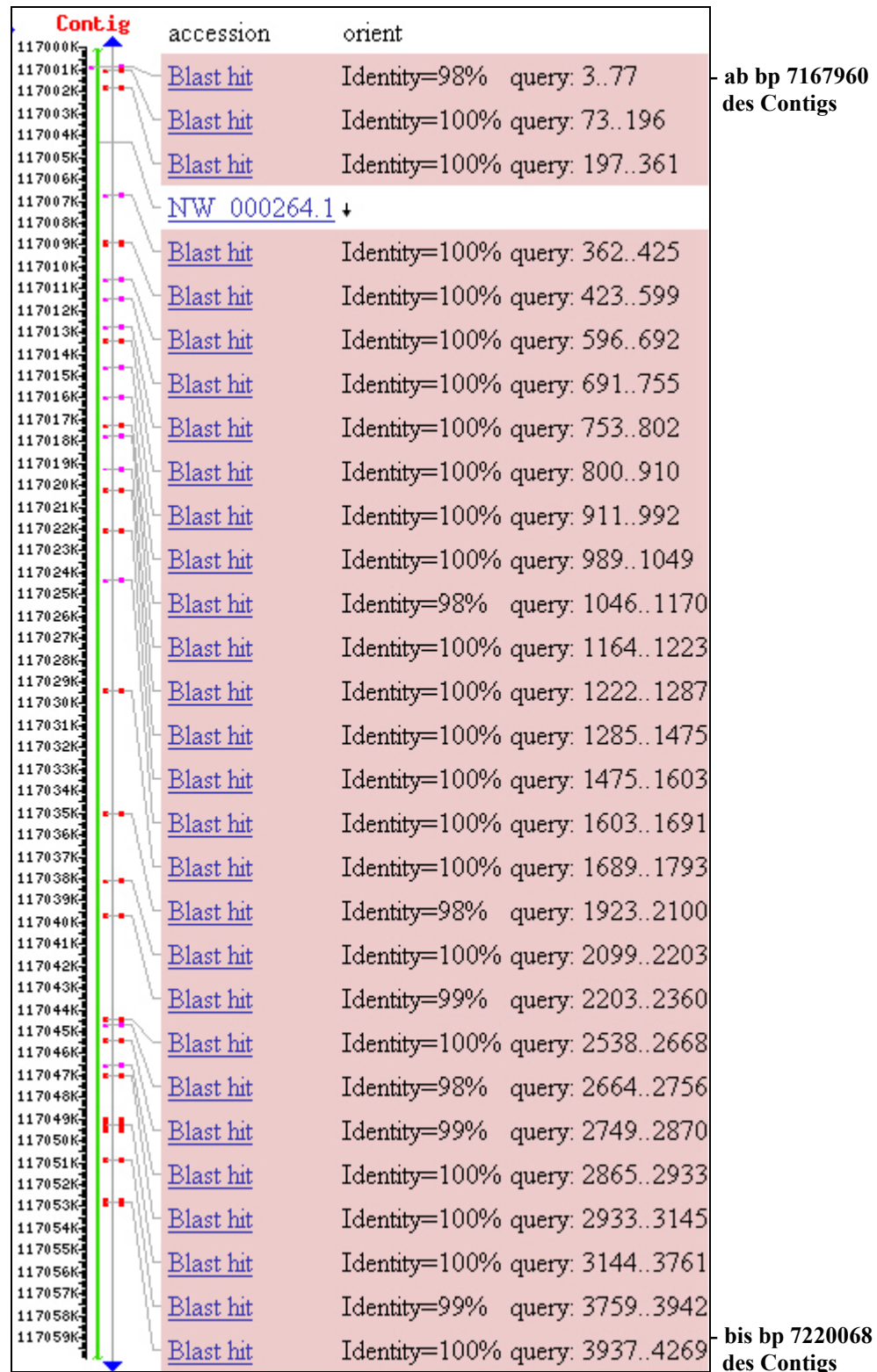


Abbildung 4.2.4: Extrahierter Genombereich der Maus. Ausschnitt des Chromosoms 6 der Maus auf welches die cDNA des KIAA0592-Homologs NP_080861 kartiert werden konnte. Diese Übersicht stellt einen ca. 60 kbp großen Abschnitt des Chromosoms (schwarze Skala) dar. Rot markiert sind die Abschnitte auf denen Teile der cDNA gefunden wurden. Diese Bereiche erstrecken sich genau über 52108 bp des Contigs NW_000264 (grün). Diese einzelnen „Blast hits“ sind unter Angabe des cDNA Abschnittes und der Identität zu dem genomischen Bereich dargestellt (Genome BLAST, NCBI).

4.2.2.2 Kartierung auf das Chromosom 4 der Ratte

Das kürzere, möglicherweise unvollständige Proteinhomolog zu KIAA0592 der Ratte, XP_232289, wird durch die cDNA XM_232289 verschlüsselt. Um die genomische Organisation der humanen KIAA0592-Genbereiche mit den entsprechenden Bereichen in der Ratte zu vergleichen, wurde diese cDNA (1242 bp) auf das Genom der Ratte kartiert (Version: RGSCv2; GenomeBLAST). Der genomische Bereich wird auf dem Chromosom 4 der Ratte durch das Contig NW_043767 repräsentiert. Abbildung 4.2.5 stellt das detaillierte BLAST Ergebnis anhand der übereinstimmenden Sequenzen (Blast Hits) dar.

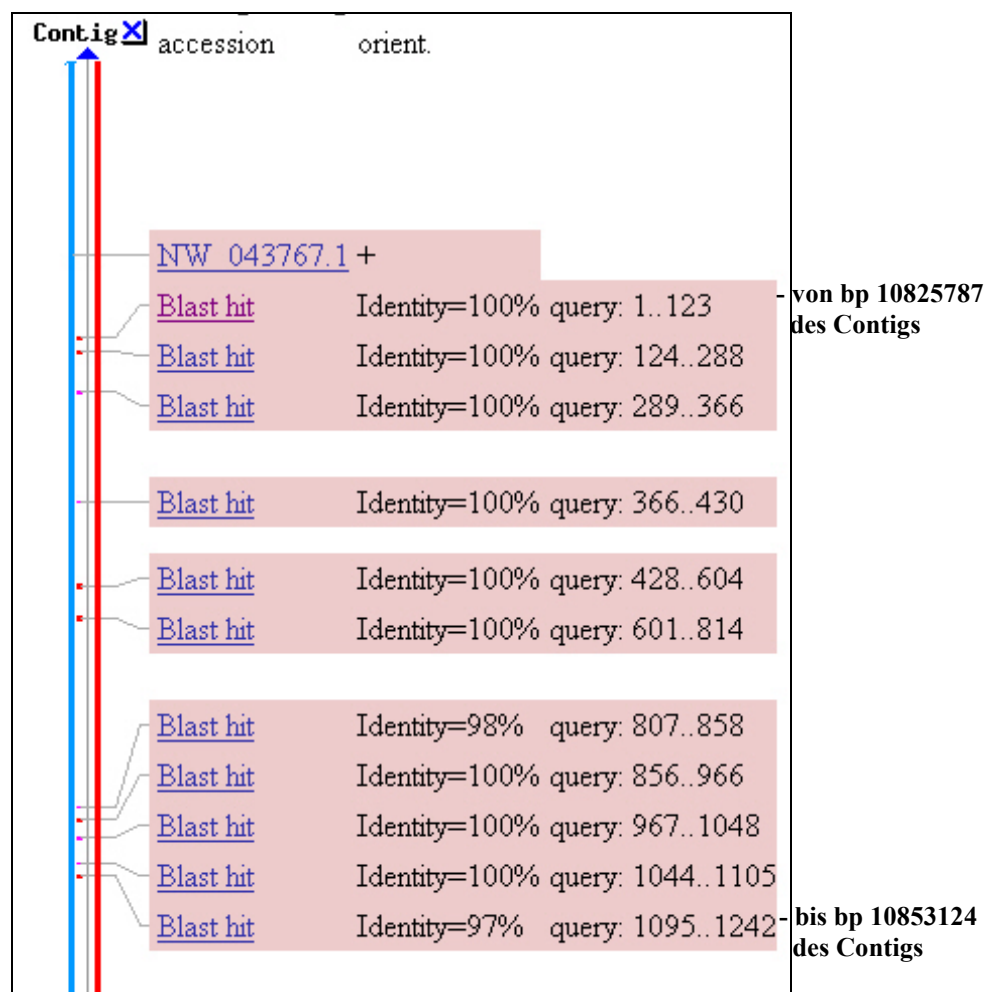


Abbildung 4.2.5: Extrahierter Genombereich der Ratte. Ausschnitt des Chromosoms 4 der Ratte auf welches die cDNA des KIAA0592-Homologs XP_232289 kartiert werden konnte. Diese Übersicht stellt einen ca. 56 kbp großen Abschnitt des Chromosomencontigs NW_043767 dar. Rot markiert sind die Abschnitte auf denen Teile der cDNA gefunden wurden. Die einzelnen identifizierten Sequenzen („Blast hits“) sind unter Angabe des cDNA-Abschnittes und der Identität zu dem genomischen Bereich dargestellt (Genome BLAST, NCBI).

Es wurden 11 Bereiche identifiziert, die mit der cDNA übereinstimmen, was wiederum auf die Exon Struktur des Gens der Ratte hindeutet. Der identifizierte Bereich erstreckt sich über ca. 30 kbp des Rattenchromosoms. Die ermittelte homologe cDNA der Ratte ist nur ein Viertel so groß wie KIAA0592, erstreckt sich aber über einen genomischen Bereich, welcher dem vergleichbaren 5' liegenden Viertel des KIAA0592-Gens ähnelt. Möglicherweise ist die Annotation der Sequenz der Ratte noch unvollständig, oder funktionale Teile, die dem KIAA0592-Protein entsprechen, sind in dieser Spezies auf getrennte Proteine verteilt.

4.3 Detektion des Transkriptes von KIAA0592

Es sollte ermittelt werden, ob das KIAA0592-Gen in verschiedenen Zelllinien verschieden effektiv transkribiert wird und ob es verschiedene mRNA Formen gibt. Die genomische Organisation weist auf eine Kopie des Gens auf Chromosom 10 hin. Das Vorhandensein von annotierten mRNA-Sequenzen, welche kürzer als KIAA0592 sind, könnte auf unterschiedliche Transkripte hinweisen.

Um die Transkription des KIAA0592-Gens (mRNA = AB011156) in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, wurden verschiedene Methoden angewandt: RT-PCR, Northern Blot, Western Blot.

4.3.1 RT-PCR – indirekte Detektion der KIAA0592-mRNA über ein cDNA-Intermediat

Das Vorhandensein der mRNA konnte semi-quantitativ durch RT-PCR Versuche ermittelt werden. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus den unten aufgeführten Zelllinien gewonnen und in cDNA umgeschrieben (Kap. 3.4).

Zelllinien:

Jurkat T-Zellen
HeLa
U87 MG
U373 MG
U251 MG
HEK293

Um möglichst viele Bereiche der sehr langen KIAA0592-mRNA durch die RT abzudecken, wurden Hexamer-Primer verwendet. Außer bei HeLa-Zellen wurden bei allen Zelllinien zwei parallele mRNA-Präparationen durchgeführt und in cDNA umgeschrieben. Um aus der so erhaltenen cDNA-Bank nun KIAA0592-spezifische Sequenzen zu amplifizieren, wurden PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt.

Hierbei wurden Primer in verschiedenen Teilbereichen der publizierten KIAA0592-Sequenz verwendet. Die Primerpaare amplifizieren spezifische Bereiche der KIAA0592-cDNA (Abb. 4.3.1.A).

Durch alle Primerpaare konnten KIAA0592-spezifische, den erwarteten Größen entsprechende DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Menge an Amplifikat nach 30 PCR-Zyklen ist bei allen Zellen, außer den U251 MG, ähnlich und liegt wahrscheinlich im Sättigungsbereich. Dadurch konnte gezeigt werden, dass mRNA Stücke die den jeweiligen Teilen der KIAA0592-Sequenz entsprechen, in den Zellen transkribiert wurden (Abb. 4.3.1.B). In U251 MG konnte nur schwach KIAA0592-cDNA amplifiziert werden.

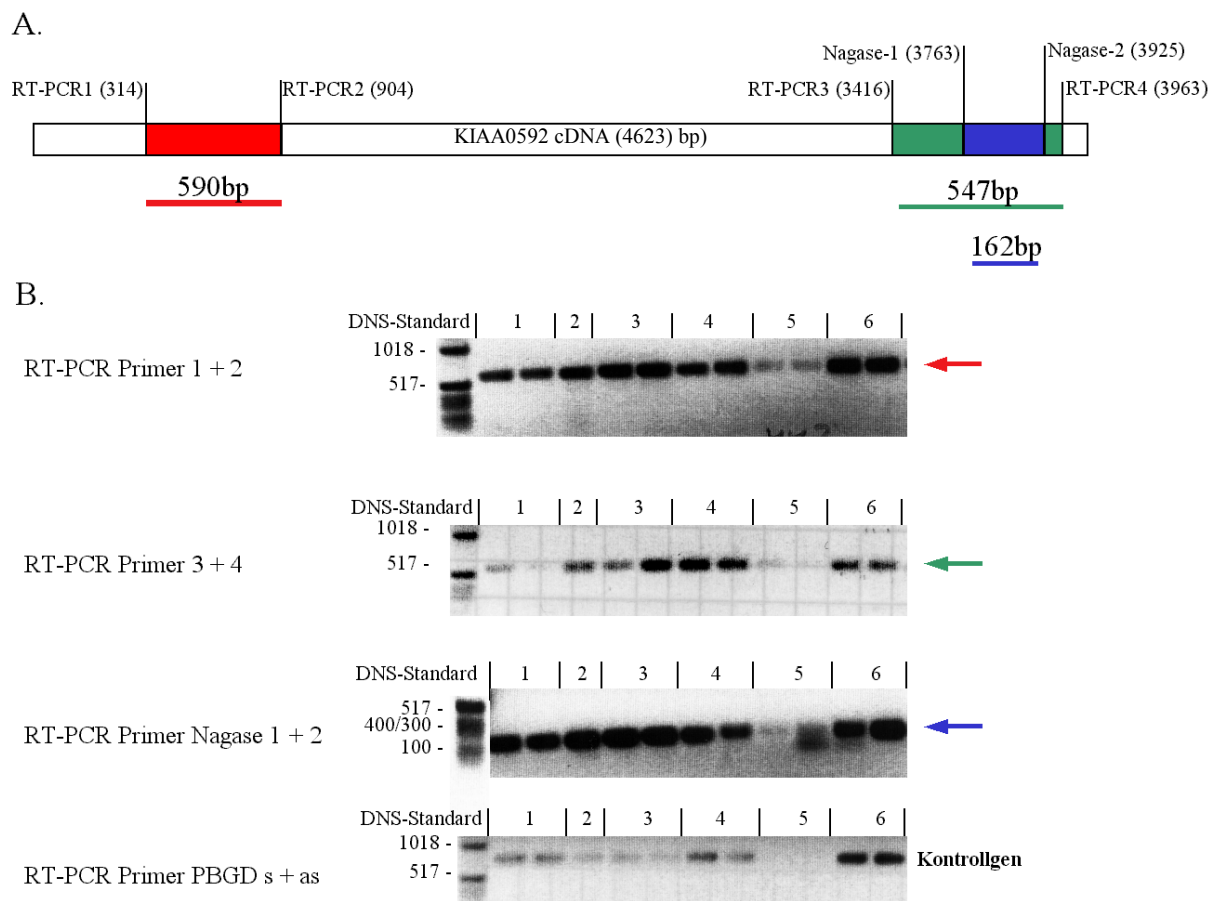


Abbildung 4.3.1: Detektion verschiedener Abschnitte der KIAA0592-cDNA durch RT-PCR in verschiedenen Zelllinien. Die amplifizierten Abschnitte (farbig) und deren Lokalisation auf der cDNA sind in A schematisch dargestellt. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in B dargestellt. Die farbigen Pfeile weisen jeweils auf das in Teil A dargestellte Fragment hin. Die cDNA-Matrizen wurden aus Jurkat T-Zellen (1), HeLa (2), U87 MG (3), U373 MG (4), U251 MG (5) und HEK293 (6) mRNA erstellt. Bei allen Ansätzen (außer HeLa) wurden zwei unterschiedliche Gesamt-RNA Präparationen parallel als Ausgangsmaterial und zur RT-PCR verwendet (je zwei Spuren).

Allerdings zeigte sich auch die cDNA der konstitutiv exprimierten Porphobilinogen Deaminase (PBGD) unter der Detektionsgrenze, was dafür spricht, dass nur sehr wenig zelluläre U251 MG-RNA bei der cDNA-Synthese vorhanden war. Die Amplifikation von genomischer DNA als Verunreinigung der mRNA-Präparationen konnte ausgeschlossen werden, da alle Primerpaare auf unterschiedlichen Exons des KIAA0592-Gens lagen und somit bei einer Verlängerungszeit von 60 Sekunden intronüberspannende Amplifikate ausgeschlossen werden konnten.

4.3.2 Northern Blot - direkte Detektion der KIAA0592-mRNA

Durch RT-PCR konnten Teile der KIAA0592-mRNA in den untersuchten Zelllinien und Zellen nachgewiesen werden. Um das gesamte KIAA0592-Transkript nachzuweisen und die wirkliche Größe zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA im Gel der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (Kap. 3.4.2). Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden von primären adulten Gehirnzellen, von U87 MG, Jurkat T-Zellen, HeLa- und HEK293-Zellen eingesetzt (s. Kap. 3.4). Das Bild einer Methylenblau-Färbung der Membran nach der Übertragung der RNA vom Gel (Abbildung 4.3.2) zeigt deutlich die beiden Hauptbestandteile zellulärer RNA, die 18 und 28s rRNA ohne sichtbare Degradationen.

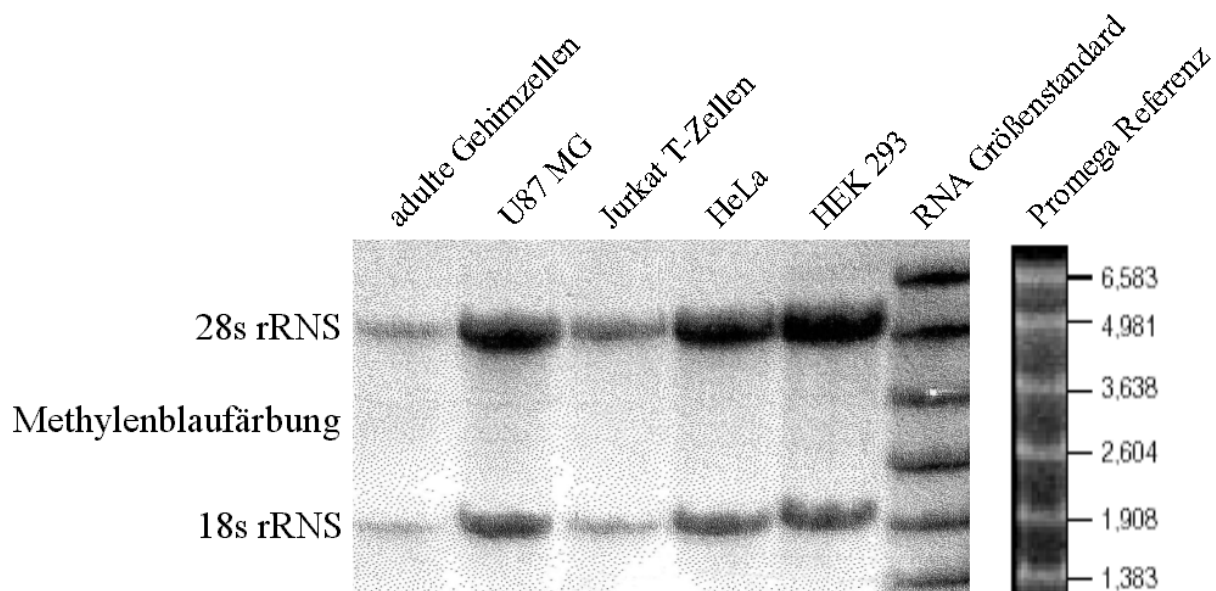


Abbildung 4.3.2: Methylenblau-Färbung der Northern Blot Membran nach dem Blotting. Die Hauptbestandteile der Gesamt-RNA Präparationen aus primären adulten Gehirnzellen, U87 MG, Jurkat T-Zellen, HeLa und HEK293, die 28s und 18s rRNA und der RNA-Marker konnten sichtbar gemacht werden und mit den Größen der Referenz (Promega Protokoll G319A) verglichen werden.

Zur Herstellung einer radioaktiven KIAA0592-spezifischen Hybridisierungsprobe wurde das PCR Protokoll für die Verwendung von ^{32}P -dCTP optimiert. Die Primer RTPCR1 und 2 wurden zur Amplifikation eines 590 nt großen Fragments aus dem Plasmid pBluescript II SK+ KIAA0592 verwendet. Abbildung 4.3.3 zeigt einen Vergleich unterschiedlicher PCR-Bedingungen zur Herstellung der KIAA0592-spezifischen Sonde. Die radioaktive Sonde ist deutlich zu erkennen (Spur 2). Die Spur 3 zeigt den identischen PCR Ansatz ohne radioaktives dCTP. Das Fragment ohne das Radionuklid wurde nur extrem schwach, beinahe unter der Detektionsgrenze amplifiziert.

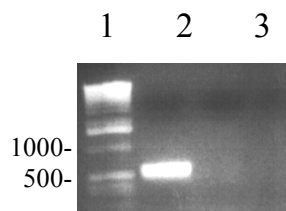
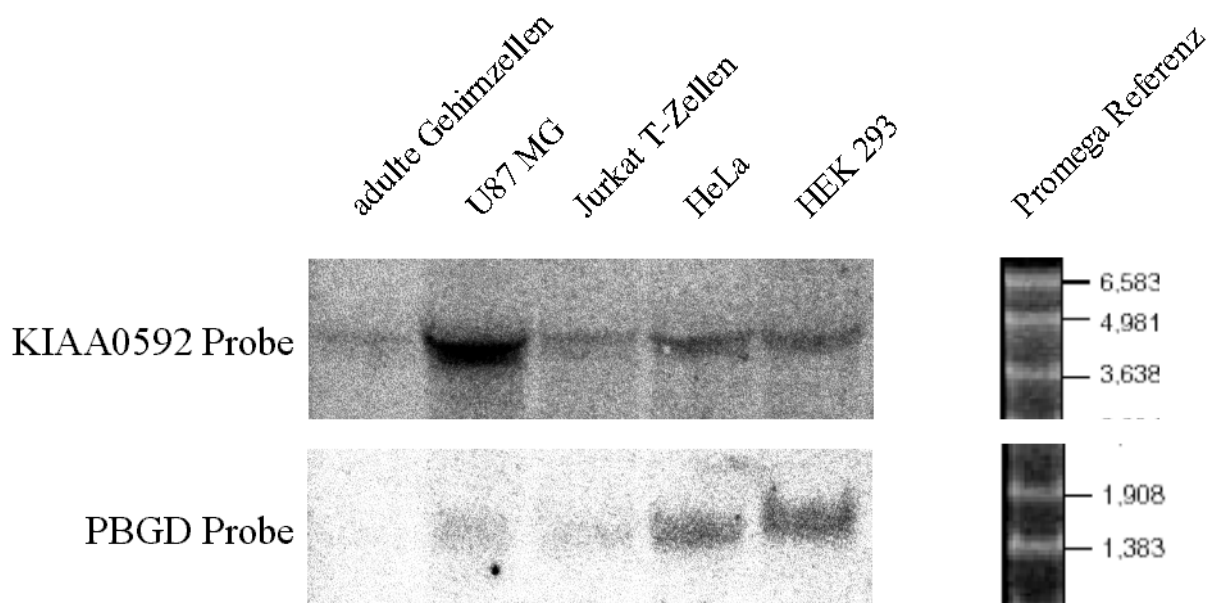


Abbildung 4.3.3: Vergleich unterschiedlicher PCR-Bedingungen zur Amplifikation einer KIAA0592-spezifischen Sequenz. Verwendet wurde das Primerpaar RTPCR 1 und 2 (Abbildung 4.3.1). In Spur 2 wurde radioaktiv markiertes dCTP (^{32}P) in Spur 3 „kaltes“ dCTP unter gleichen limitierenden Nukleotid- und Primerkonzentrationen verwendet. Die PCR ist optimiert für die Verwendung von radiaktiven dCTP.

Die Einzelstränge der Sonde sind komplementär zu einem Teil des 5'Bereiches der KIAA0592-Sequenz (Abbildung 4.3.1). Die Sonde hybridisierte in allen untersuchten Zellen spezifisch an ein etwa 4,5-4,9 kb großes RNA-Transkript.

Es zeigte sich eine einzelne Bande bei allen getesteten Zellen (Abb 4.3.4). Die Größe der detektierten Bande entspricht der Länge des im pBluescript II SK+ vorhandenen cDNA-Klons von KIAA0592 mit 4623 bp (s. Kap 2.5.1). Auf dem gleichen Blot wurde nach dem Entfernen der ersten Hybridisierungsprobe das Transkript des Porphobilinogen-Deaminase-Gens (PBGD) mit einer weiteren Probe nachgewiesen. Die Menge an detektiertem PBGD-Transkript variierte trotz gleicher Mengen an eingesetzter Gesamt-RNA erheblich.

Abbildung 4.3.4: (siehe nächste Seite) Detektion der KIAA0592-mRNA. Ein Northern Blot von Gesamt-RNA, isoliert aus primären adulten Gehirnzellen, Jurkat T-Zellen und Zellen der Linien U87 MG, HeLa und HEK293, wurde mit einer KIAA0592-spezifischen Probe (PCR amplifiziert, Abb. 4.3.3) hybridisiert. Als Expressionskontrolle dient die Detektion der Porphobilinogen Deaminase (PBGD) mRNA. Die Größen wurden durch einen Vergleich mit der Methylenblau-Färbung des Blots bestimmt. Die zugehörigen Referenzwerte sind dargestellt.



4.4 Detektion des exprimierten KIAA0592-Proteins

Da alle publizierten Sequenzen ausschließlich unbekannte und bisher noch hypothetische Proteine darstellten, sollte die Expression des KIAA0592-Proteins untersucht werden. Gegen das Risp-Fragment von KIAA0592 ließen sich monoklonale Antikörper herstellen (Dr. E. Kremmer, GSF). Diese Antikörper wurden verwendet, um das KIAA0592-Protein in menschlichen Zellen nachzuweisen. Dabei sollte sowohl das endogene als auch das von einem Expressionsvektor mit der KIAA0592-Sequenz produzierte exogene KIAA0592komplett nachgewiesen werden.

4.4.1 Herstellung von KIAA0592komplett-exprimierenden Plasmidvektoren

Zu diesem Zeitpunkt lag die KIAA0592-cDNA in dem pBluescript II SK+ Vektor vor, der keine eukaryotische Expressionsfähigkeit besitzt. Um die vollständige Sequenz von KIAA0592 (siehe Kap. 4.1) in humanen Zellen zu exprimieren, wurde die cDNA durch PCR amplifiziert. Dabei wurden am 5' Ende die durch *in silico*-Methoden identifizierten 57 Basenpaare inklusive einem Start-ATG (Abb. 4.1.2) eingefügt, welche der cDNA verglichen zur kompletten KIAA0592-Sequenz fehlen. Außerdem wurden am 5'- und 3'-Ende Restriktionsschnittstellen (NheI oder BamHI) angefügt, die nicht in der KIAA0592-Sequenz vorhanden waren. Das so erhaltene ca. 4,2 kbp große DNA Fragment enthielt nun den gesamten kodierenden Bereich des KIAA0592-Gens. Gleichzeitig wäre nach Einfügen des KIAA0592 PCR-Produkts in das

pCR®2.1Topo Vektorsystem die Möglichkeit gegeben, über einen Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen, die KIAA0592-Sequenz zu isolieren und in die gewünschten eukaryotischen Expressionssysteme zu inserieren.

Das Einfügen des gereinigten PCR-Produkts in das pCR®2.1Topo Vektorsystem führte in mehreren Ansätzen zum Verlust von kodierenden Bereichen der KIAA0592-Sequenz. Ebenso verursachte der direkte Restriktionsverdau des PCR-Produkts und eine nachfolgende Inserierung in die geschnittenen eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3 und pFRED wiederholt einen Verlust größerer Bereiche. Dagegen konnte durch Befreien des PCR-Fragments von überhängenden Enden („polishing“) und nachfolgender Insertion in den pPCR Script™ Amp SK+ PCR-Klonierungsvektor die komplette KIAA0592-Sequenz erstmals in einen Klonierungsvektor eingefügt werden. Nach einer vollständigen Sequenzierung des inserierten KIAA0592 stellte sich heraus, dass im Klon #1.4 durch die PCR Amplifikation Codons verändert worden waren, was zum Austausch der folgenden Aminosäuren S450→F, T468→A, T1169→A, S1263→G führte. Auf Grund der extrem schwierigen Klonierung der kompletten KIAA0592-Sequenz wurde der Klon #1.4 für die weiteren Experimente eingesetzt.

Das entstandene Plasmid pPCR-60KIAA0592 verfügte über keine Module zur Expressionsteuerung. Deshalb wurden die zur Transkription und Translation nötigen Sequenzen in den Vektor im korrekten Kontext zur KIAA0592-Sequenz kloniert. Zur Regulation der Transkription von KIAA0592 wurde der frühe Promotor des Cytomegalovirus (CMV) in Kombination mit einem synthetischen Intron, vor die kodierende Sequenz des KIAA0592 gesetzt. Als spezifisches Polyadenylierungssignal wurde die SV40polyA-Sequenz im Anschluss an die KIAA0592-Sequenz in den Vektor eingefügt. Beide Bereiche wurden aus dem pBIND-Vektor (Promega) übernommen.

Als Alternative zum so etablierten pCMV-60KIAA0592pA wurde der kodierende Bereich von KIAA0592 komplett durch Restriktionsverdau isoliert und im Austausch gegen das GFP-Reportergen in Expressionsplasmid hGfa-EGFP kloniert. Dieses Plasmid sollte eine konstitutive Expression von KIAA0592 in GFAP („glial fibrillary acidic protein“)-exprimierenden Zellen erlauben. GFAP ist ein Marker für Astrozyten (Brenner et al., 1994), daher sollte dieser Promotor in U251 MG aktiv sein. Für HEK293 wurde allerdings auch die Expression von neuronalen Markern beschrieben (Shaw et al., 2002) und somit kann eine Expression durch den hGfa-Promotor möglicherweise auch hier ablaufen.

4.4.2 Detektion des KIAA0592-Proteins im Western Blot

Die Expressionskonstrukte pCMV-60KIAA0592pA und hGfa-60KIAA0592 wurden auf ihre Fähigkeit zur Expression von KIAA0592komplett in den Zelllinien HEK293 und U251 MG im Western Blot getestet. Die U251 MG Astrozytom-Zelllinie wurde ausgewählt, da GFAP in dieser Zelllinie als Astrozyten-spezifisches Protein hoch exprimiert ist und somit der Promotor hier aktiv sein sollte. Die Zelllinien wurden jeweils mit folgenden Konstrukten transient transfiziert (Kap. 3.1.):

1. pCMV-60KIAApA
2. hGfa-60KIAA
3. pCsRev-sg143
4. pEGFP-1
5. pFRED-Rev1-54Risp 4GFP

Zu den Expressionskonstrukten (1 bis 3) und zu dem promotorlosen pEGFP-1 (4) wurde als Transfektionskontrolle ein 4GFP-Expressionsplasmid (= vier fusionierte GFP-Domänen) kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, Zelllysate hergestellt, die Proteine mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran überführt. Zur genauen Bestimmung der Größe der KIAA0592-Proteine wurde neben dem Rainbow™ Proteinstandard ein 160 kDa großes Fusionsprotein aus den 54 N-terminalen Aminosäuren von Rev, dem kompletten Risp (170 AS) und 4GFP mit untersucht. Das Fusionskonstrukt diente ebenso als Positivkontrolle für die verwendeten Risp/KIAA0592-spezifischen und GFP-spezifischen Antikörper und wurde in HEK293-Zellen exprimiert (5).

Abbildung 4.4.1 zeigt die immunologische Detektion der verschiedenen Proteine auf der Membran durch Inkubation mit folgenden Antikörpern. Zur Detektion von Risp und KIAA0592 wurde der monoklonale Risp-spezifische Antikörper 8A11-1-1 aus der Ratte verwendet. GFP wurde durch den monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper aus der Maus detektiert und Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) durch einen monoklonalen GAPDH-spezifischen Antikörper aus der Maus. Die Abbildung vergleicht die Proteinexpression in beiden Zelllinien. Es zeigte sich anhand der GFP-Expression bei einer identischen Menge an verwendetem Protein pro Laufspur, dass die HEK293-Zelllinie deutlich mehr Protein von den transfizierten Plasmiden produzierte, als die U251 MG-Linie. Innerhalb jeder Zelllinie zeigte sich eine vergleichbare Expression von 4GFP nach der Transfektion. Das Fusionskonstrukt Rev1-54Risp4GFP wird in HEK293-Zellen produziert. Die Antikörper gegen GFP zeigten deutliche Abbau- oder Intermediärbanden, die nicht durch den Risp-spezifischen Antikörper erkannt wurden. Die Detektion des endogenen, zum Grundmetabolismus gehörenden Proteins GAPDH zeigte, dass sich die Gesamtmenge

an Protein zwischen den einzelnen Proben sowie zwischen den Zelllinien vergleichen lässt. Die durch einen CMV Promotor getriebene Expression von KIAA0592komplett (1) konnte in HEK293 und U251 MG deutlich nachgewiesen werden.

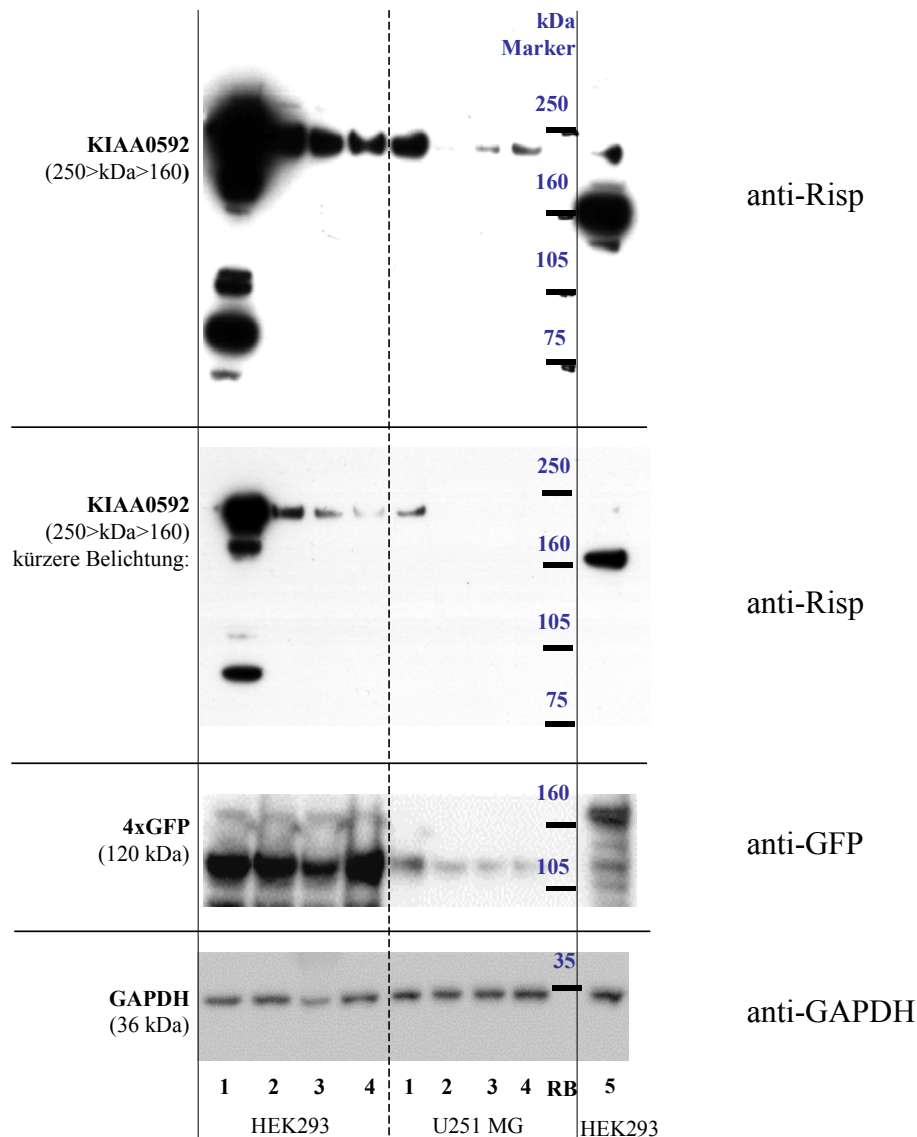


Abbildung 4.4.1: Detektion des KIAA0592-Proteins. HEK293- und U251 MG-Zellen exprimieren KIAA0592komplett stark unter der Kontrolle des CMV-Promotors (transfiziert mit pCMV-60KIAApA in den Spuren 1) oder nur schwach endogenes KIAA0592 (pCsRev-sg143 in 3 und pEGFP-1 in 4). Unter der Kontrolle des hGfa-Promotors (hGfa-60KIAA in 2) wird KIAA0592 in HEK293 nur gering bzw. in U251 MG überhaupt nicht exprimiert. Eine kurze Belichtung des Filmes lässt eine genauere Detektion der starken Banden bei HEK293 zu, eine lange Belichtung ermöglicht die Detektion der schwachen Banden bei U251 MG. Der Risp/KIAA0592-spezifische Antikörper und der GFP-Antikörper erkennen das Fusionskonstrukt Rev1-54Risp4GFP (5). Die Proteinmenge kann anhand der Expression der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) verglichen werden.

Es handelt sich bei KIAA0592 um ein ca. 200 kDa großes Protein. In den Ansätzen 3 und 4 wurde kein KIAA0592-exprimierendes Plasmid transfiziert, also stellt die hier sichtbare Bande in den Zellen endogen produziertes Protein dar. Die Expression durch den pCMV-60KIAA0592pA (1) ist deutlich erhöht im Vergleich zu der endogenen KIAA0592-Expression (3 und 4). Der hGfa-Promotor war in der Lage in HEK293 (3) die Expression noch über dem Stand des endogenen Produktes anzuschalten, wohingegen in der Astrozytomlinie (3) keine Erhöhung erkennbar ist. Das endogene Produkt ist jeweils erst nach einer langen Expositionszeit (25 min) zu erkennen. Bei einer kürzeren Expositionszeit (1 min) war nur ein Produkt in den mit dem exogenen KIAA0592-Plasmid transfizierten Ansätzen zu detektieren.

Das Ergebnis des immunologischen Proteinnachweises des exogen und des endogen produzierten KIAA0592 ist in Abbildung 4.4.2 dargestellt. Um die Spezifität der detektierten Banden nachzuweisen wurden die verschiedenen Zelllinien HeLa, U87 MG, U251 MG, U373 MG und Jurkat T-Zellen verwendet. Dabei wurden folgende Expressionsplasmide verwendet und transient transfiziert:

1. das KIAA0592komplett Expressionskonstrukt (pCMV-60KIAA0592pA (Spuren 1)
2. der promotorlose Kontrollvektor pPCR-60KIAA0592 (Spuren 2),
3. der Kontrollvektor pFRED-Rev1-54Risp4GFP (Spuren 3, als Antikörperkontrolle)

Die Expression der KIAA0592-Proteine wurde durch einen weiteren monoklonalen Risp-spezifischen Antikörper 5D3-13211 in drei Zelllinien im Vergleich mit untransfizierten Zellen (Spur Ø) untersucht (Abb. 4.4.2).

Nur in U251 MG konnte das von einem exogenen Plasmid kodierte KIAA0592komplett (Spur 1) detektiert werden. In allen Zelllinien, außer Jurkat, konnte mit diesem Risp-spezifischen Antikörper endogenes KIAA0592-Protein (Spuren Ø, 2 und 3) nachgewiesen werden. In den Zelllinien wurde das Rev1-54Risp-Fusionskonstrukt (Spur 3) ebenfalls von dem Antikörper detektiert. In Jurkat T-Zellen konnte kein, von einem transfizierten Plasmid exprimiertes, Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ließ sich das endogene KIAA0592 zeigen. Diese Jurkat-T-Zelllinie war die ursprüngliche Quelle der cDNA-Bank, in welcher die Risp-Sequenz identifiziert wurde.

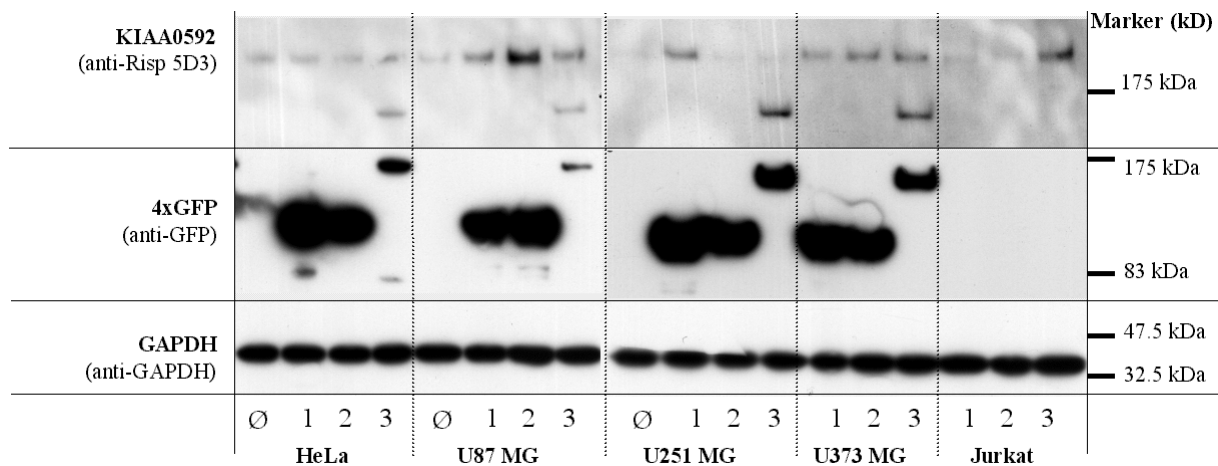


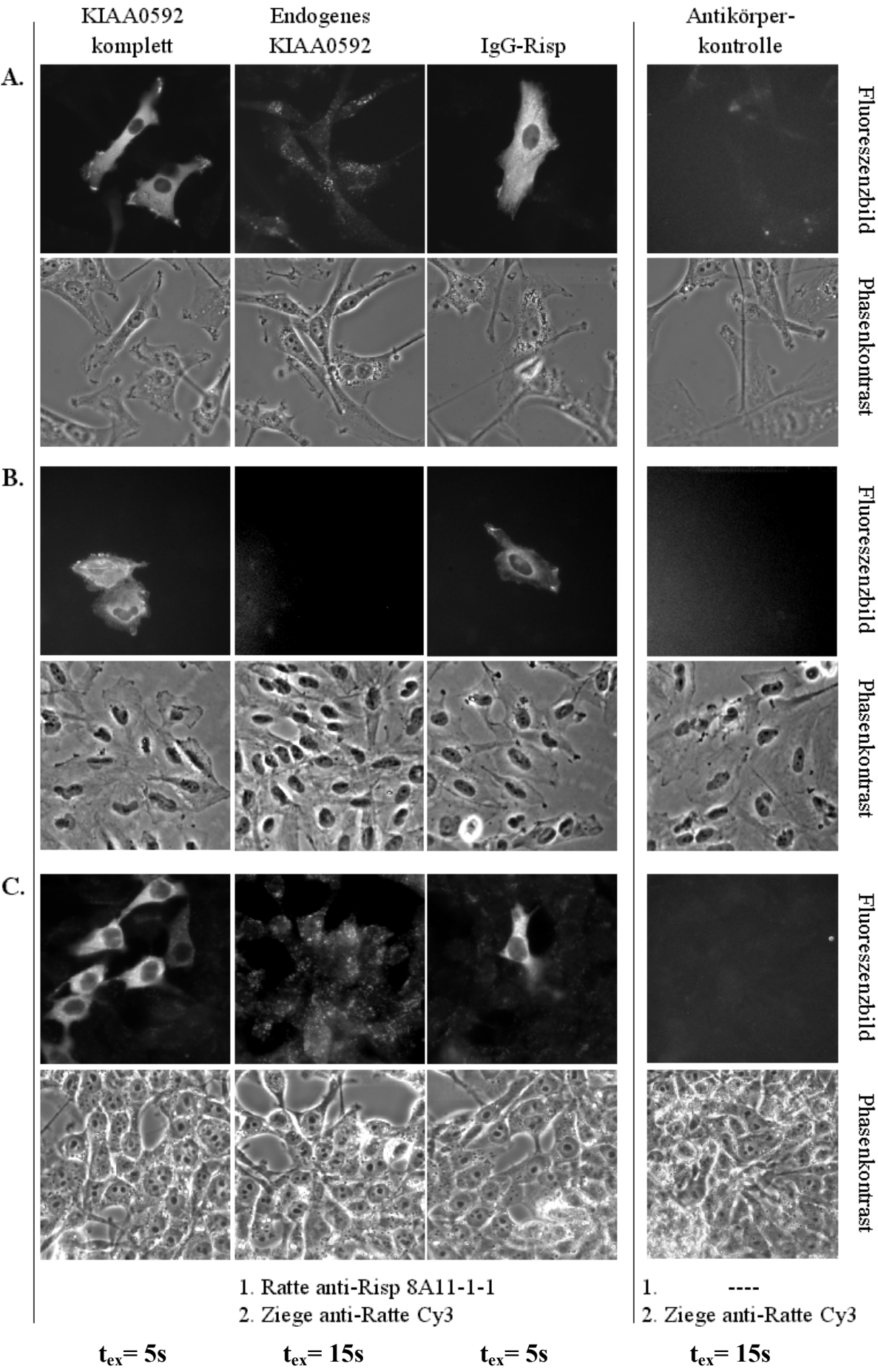
Abbildung 4.4.2: Expression von KIAA0592 im Vergleich verschiedener Zelllinien. Die Zellen wurden mit pCMV-60KIAA0592 (1), pPCR-60KIAA0592 (2), pFREDRev1-54Risp4GFP (3) transfiziert. PFRED-4GFP wurde separat transfiziert (0) oder kotransfiziert (1 und 2). Die Detektion des exogenen Proteins der KIAA0592komplett cDNA (1) konnte nur in U251 MG anhand der Expressionsstärke unterschieden werden. Die Expression eines endogenen etwa 200 kDa großen KIAA0592 (0, 2 und 3) wurde durch den Risp spezifischen Antikörper 5D3-13211 in allen Zellen bestätigt. In allen Zelllinien, außer den Jurkat, wurde auch das Fusionsprotein zwischen Rev1-54Risp und einem 4GFP-Rest durch den Antikörpern erkannt. Ein anti-GFP-Antikörper erkennt 4GFP und das Fusionsprotein (3). In Jurkat T-Zellen konnte kein Produkt eines transfizierten Plasmids detektiert werden. Es konnte hier nicht zwischen endogenem und exogenem KIAA0592-Protein unterschieden werden.

4.4.3 Detektion und Lokalisation des KIAA0592-Proteins in verschiedenen Zelllinien

Nachdem die Expression von KIAA0592komplett durch das Vorhandensein der Proteine im Zelllysat nachgewiesen wurde, sollte nun die tatsächliche Expression und Lokalisation des endogenen und des exogenen KIAA0592 in Zellen ermittelt werden. Die Expression von KIAA0592 in U87 MG-, U251 MG- und HeLa-Zellen, detektiert durch indirekte Immunfluoreszenz, ist in Abbildung 4.4.3 dargestellt. Als Kontrolle der Antikörperfärbung diente wiederum ein Risp-Fusionsprotein, welches von dem Expressionsplasmid cIg-Risp kodiert wird. Um unspezifische Bindungen des sekundären, fluoreszierenden Antikörpers (Cy3) auszuschließen, wurde dieser einzeln mit den Zellen inkubiert (Antikörperkontrolle). Diese Kontrolle zeigte keinerlei Fluoreszenz. Das KIAA0592komplett-Protein, welches durch ein exogenes, transfiziertes Plasmid kodiert wurde konnte in allen drei Zelllinien deutlich nachgewiesen werden. In U87 MG- (A) und HeLa-Zellen (C) lokalisiert KIAA0592komplett deutlich akkumulierend im Zytoplasma der Zellen. In den U251 MG-Zellen (B) ist ebenfalls diese Akkumulation zu beobachten. Zum Teil wird KIAA0592komplett auch im Zellkern erkannt. U87 MG (A) und HeLa-Zellen (B)

ohne transfiziertes KIAA0592komplett-Expressionsplasmid zeigten deutlich das endogene Protein. Die Expression ist, wie nach den Northern und Western Blot Daten zu erwarten war, allerdings gering. Auffällig war, dass das endogene Protein zwar ebenfalls, wenn auch nicht so deutlich, im Zytoplasma zu akkumulieren schien, aber dort zum Teil als punktförmige aggregatähnliche Strukturen vorliegt. Im Gegensatz dazu ist KIAA0592komplett gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. In U251 MG-Zellen konnte das endogene KIAA0592-Protein nur extrem gering detektiert werden. Der Antikörper erkennt in allen drei Zelllinien zudem das exprimierte IgGRisp-Fusionsprotein, das deutlich im Zytoplasma akkumuliert.

Abbildung 4.4.3: (siehe nächste Seite) Detektion des KIAA0592-Proteins durch indirekte Immunfärbung in verschiedenen Zellen. U87 MG- (A), U251 MG- (B) und HeLa- (C) Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für die Proteine IgG-Risp (cIg-Risp) und KIAA0592komplett (pCMV-60KIAA0592pA) transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und eine indirekte Immunhistochemie wurde mit dem monoklonalen Ratten anti-Risp 8A11-1-1 und einem Cy3-gekoppelten Ziege anti-Ratte Antikörper durchgeführt. Untransfizierte Zellen jeder Linie wurden zur Detektion des endogenen KIAA0592-Proteins ebenso immunologisch gefärbt und zusätzlich als Negativkontrolle des sekundären Antikörpers alleine verwendet. Von den Zellen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop monochrome Bilder des Phasenkontrastes und der roten Cy3-Fluoreszenz mit den angegebenen Belichtungszeiten t_{ex} (32x Objektiv) erstellt.



Die Untersuchungen wurden mit der ElDorado Software durchgeführt. In der Abbildung 4.5.1 ist der untersuchte Bereich graphisch dargestellt. Die Lokalisation der Promotorbereiche (gelb) sind in Bezug zu den annotierten Primärtranskripten (braun), den Transkriptionsstartstellen (TSS) und den kartierten ersten zwei Exons des 5' Endes der KIAA0592-cDNA bzw. der KIAA0592komplett-Sequenz gezeigt. Zwei überlappende Promotorbereiche in jeweils entgegengesetzten Strangorientierungen konnten identifiziert werden. Der Bereich, welcher der KIAA0592-Orientierung entspricht, überlappt mit dem ersten Exon der cDNA. Eine durch den PromoterInspector vorausgesagte Region überlappt mit dem annotierten Promotorbereich, liegt jedoch innerhalb der Transkripte nach dem Transkriptionsstart (TSS) und kann somit weder für die hier annotierten Gene noch für KIAA0592 eine Rolle spielen. Dies zeigte, dass *in silico* Analysen Vorhersagen darstellen, welche *in vivo* verifiziert werden müssen und eine endgültige Zuordnung eines Promotors zu einem Gen erst danach erfolgen kann.

Tabelle 4.5.1 gibt detailliert die Lage und den Zusammenhang der in Abbildung 4.5.1 gezeigten Transkripte und der Promotorbereiche wieder. Hierbei ist in den ersten zwei Spalten der Bereich auf dem extrahierten Fragment des Contigs angegeben, in der dritten Spalte Länge des Elements und die Strangorientierung, in der vierten die funktionale Eigenschaft, in der fünften die Namen der zugehörigen Bereiche oder Transkripte und in der letzten die Überschneidung der untersuchten Sequenzen mit umliegenden Bereichen. Gelb unterlegt sind wiederum die durch „Oligo-Capping“ verifizierten genassoziierten Promotoren, rot die ermittelten Transkriptionsstartstellen (TSS), grün ein 5' nicht translatierter Bereich (UTR) und braun die annotierten Transkripte. Dazu ist noch der durch das Programm PromoterInspector vorausgesagte Promotor angegeben. Es wurden zwei mögliche genassoziierte Promotoren in positiver Orientierung in Leserichtung vor dem KIAA0592-Gen identifiziert. Einer dieser Promotoren ist direkt experimentell dem AK001686 zugeordnet, der andere dem Transkript XM_051956. Die Voraussage des PromoterInspectors liegt deutlich im Transkript von KIAA0592 und überschneidet sich mit dessen zweiten Exon und Intron. Wie in Kapitel 4.2.1 dargelegt, entspricht die KIAA0592-cDNA der genomischen Organisation von AK001686 und XM_051956. Die KIAA0592-cDNA (AB011164) und das Transkript des XM_051956 beginnen dabei identisch. AK001686 ist 15 bp weiter stromabwärts annotiert, die potenzielle verlängerte Sequenz von KIAA0592komplett beginnt 57 bp stromaufwärts. Im weiteren Bereich stromaufwärts sind drei durch „Oligo-Capping“ verifizierte Promotorbereiche annotiert.

Nachdem die Sequenzen stromaufwärts von KIAA0592 auf annotierte Promotorsequenzen untersucht wurden, sollte das Vorhandensein und die Zusammensetzung von annotierten regulatorisch wirksamen Modulen in diesem Bereich untersucht werden.

Von	Bis	Länge	Eigenschaft	Name	Überschneidungen
51241	51841	601 bp +	genassoziiertes Promotor	Assoziiertes Transkript XM_051956 experimentell verifiziert	Basis: „Oligo capped“ AK001686 , 100 bp Überschneidung 5' Ende AK001686 . Überschneidung Exon 1 AK001686 . <u>Überschneidung mit Exon 1 KIAA0592</u>
51241	51841	601 bp +	genassoziiertes Promotor	Assoziiertes Transkript AK001686 experimentell verifiziert	Basis: „Oligo capped“ AK001686 , 100 bp Überschneidung 5' Ende AK001686 . Überschneidung Exon 1 AK001686 . <u>Überschneidung mit Exon 1 KIAA0592</u>
51522	52122	601 bp (-)	genassoziiertes Promotor	Assoziiertes Transkript AK056375 experimentell verifiziert	Basis: „Oligo capped“ AK056375 , 100 bp Überschneidung 5' Ende AK056375 .
51622	51622	1 bp (-)	TSS	TSS	„Oligo_capped“ AK056375_1
51726	117321	65596 bp +	Haupttranskript	XM_051956	Hypothetisches Protein XM_051959 <u>Überschneidung mit KIAA0592</u>
51726	51824	99 bp +	5'UTR	XM_051956	<u>Überschneidung mit Exon 1 KIAA0592</u>
51741	117321	65581 bp +	Haupttranskript	AK001686	Komplette mRNA durch „Oligo capping“ Methode <u>Überschneidung mit Exon 1 KIAA0592</u>
51741	51741	1 bp +	TSS	TSS	„Oligo_capped“ AK001686_1 <u>Überschneidung mit Exon 1 KIAA0592</u>
51965	52160	196 bp n/a	PromoterInspector Voraussage	PI010735	196 bp Überschneidung 5' Ende AK001686 . Überschneidung Exon 2 AK001686 . <u>Überschneidung mit Exon 2 KIAA0592</u>

Tabelle 4.5.1: Detaillierte Annotationen der Sequenzen stromaufwärts angrenzend und überlappend an das KIAA0592-Gen (Contig NT_033898 (+) von Chromosom 10). Das untersuchte Teilstück des Contigs enthält 122,3 kbp. Unterschieden wurde nach experimentell durch „Oligo-Capping“ verifizierten Promotoren (gelb), und Transkriptionsstarts (TSS, rot), Promotorvorhersagen (PromoterInspector) und Primärtranskripten (braun). Die Promotoren für AK001686 und XM_051956 sind identisch. Das Haupttranskript von XM_051956 ist 5' identisch mit KIAA0592 (beide starten bei 51726 bp). Ein zugehöriger TSS ist nicht ermittelt, der zu AK001686 gehörige TSS (51741 bp) liegt schon im KIAA0592-Transkript. Überlappend mit dem KIAA0592- und dem XM_051956-Transkript in Gegenstrangorientierung liegt ein weiterer Promotorbereich.

Diese Module basieren auf Ähnlichkeiten in den Bestandteilen (TF-Bindungsstellen) auf Sequenzebene. Die Suche nach Promotormodulen, welche einen Hinweis auf die Eigenschaften der regulatorischen KIAA0592-Sequenzen geben könnten, ergaben die in Tabelle 4.5.2 beschriebenen Kandidaten.

A. Modul: AP1F_CEBP_01 (675 - 641 in - Strangrichtung) Modelbewertung = 96.1 %						
Matrizelement Modelelement	Position	+/-	Sequenz	Core sim.	Mat. sim.	Abstand zum nächsten Element
V\$AP1F/AP1.02	655 - 675	+	TCGGCTGACTGCAACCTTGGT	1.000	0.961	15 bp
V\$CEBP/CEBPB.01	641 - 659	+	GGAGTGGTGCAATCTCGGC	1.000	0.961	---
B. Modul: GATA_HNF1_01 (1766 - 1794 in + Strangrichtung) Modelbewertung = 91.1 %						
Matrizelement Modelelement	Position	+/-	Sequenz	Core sim.	Mat. sim.	Abstand zum nächsten Element
V\$GATA/GATA1.02	1766 - 1778	+	TTGGGATAATCAG	1.000	0.992	14 bp
V\$HNF1/HNF1.01	1778 - 1794	+	GGTTATTTAATGAGGTG	1.000	0.829	---
C. Modul: FKHD_FKHD_01 (1162 - 1110 in - Strangrichtung) Modelbewertung = 90.9 %						
Matrizelement Modelelement	Position	+/-	Sequenz	Core sim.	Mat. sim.	Abstand zum nächsten Element
V\$FKHD/FREAC7.01	1146 - 1162	+	TTAGGATAAATACATAA	1.000	0.933	36 bp
V\$FKHD/XFD1.01	1110 - 1126	(-)	ATCATTTAAATATCAGT	1.000	0.884	---
D. Modul: CREB_NFAT_NFAT_01 (947 - 993 in + Strangrichtung) Modelbewertung = 85.6 %						
Matrizelement Modelelement	Position	+/-	Sequenz	Core sim.	Mat. sim.	Abstand zum nächsten Element
V\$CREB/E4BP4.01	947 - 967	+	CTAATCATAAGTAAGTTACTT	1.000	0.794	12 bp
V\$NFAT/NFAT.01	964 - 974	(-)	AAAGGAGAAGT	0.764	0.819	19 bp
V\$NFAT/NFAT.01	983 - 993	(-)	TGAGGAAACTG	1.000	0.957	---

Tabelle 4.5.2.: Ermittelte Promotormodule (ModelInspector, Genomatix) in den 2650 bp stromaufwärts der kartierten genomischen KIAA0592-Sequenz einschließlich der annotierten Sequenzen der Promotoren von AK001686 und XM_051956. Die Tabelle listet die Module nach der Modelbewertung auf. Zwei Module sind in Strang- (B, D) und zwei in Gegenstrangorientierung (A, C) beschrieben. Die Positionen sind bezogen auf einen 2650bp großen untersuchten Bereich vor der kartierten KIAA0592-Sequenz. Modul B beginnt somit 844 bp vor dem ersten kartierten KIAA0592-Exon, Modul D 1703 bp davor.

Es konnten vier Module identifiziert werden. Modul A besteht aus zwei TF-Bindungsstellen und wurde beschrieben durch die Abhängigkeit des Promotors des „human scavenger receptors“ (SR-A) von den Faktoren AP-1/c-Jun und C/EBPbeta (Mietus-Snyder, Glass, and Pitas, 1998). Das Modul kommt statistisch 0,5 mal pro 10^4 bp der menschlichen DNA-Sequenz vor. Modul B besteht ebenfalls aus zwei TF-Bindungsstellen. Das Modul ist Teil des Promotors der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase (Krasinski et al., 2001) und trägt zu dessen Aktivierung bei. Das Modul kommt statistisch 0,7 mal pro 10^5 bp der menschlichen DNA-Sequenz vor. Das Modul C besteht aus zwei identischen Bindungsstellen und ist an der Transkription des murinen, Hepatocyten-spezifischen Präalbumingens beteiligt (Costa and Grayson, 1991). Das Modul kommt statistisch 0,8 mal pro 10^4 bp der menschlichen DNA-Sequenz vor. Das Modul 1D besteht aus drei TF-Bindungsstellen und ist an der synergistischen Aktivierung des menschlichen TNF-alpha Gens durch hohe NFAT-Konzentrationen beteiligt (Falvo et al., 2000). Das Modul kommt statistisch 0,3 mal pro 10^4 bp der menschlichen DNA-Sequenz vor.

Die *in silico* Analysen der stromaufwärts-Sequenz von KIAA0592 zeigten, dass es sich dabei um regulatorisch wirksame Bereiche (Promotoren) mit beschriebenen Promotormodulen handelt. Zwei Sequenzabschnitte, welche diese identifizierten Bereiche enthielten oder darüber hinaus gingen, wurden weiter funktionell untersucht. Das Adenin des ersten ATG-Codons von KIAA0592komplett (Abb. 4.1.2) wurde als Nukleotid +1 definiert.

Anhand der *in silico* Analyse wurden für weitere Experimente die genomischen Bereiche vor der KIAA0592komplett-Sequenz ausgewählt, welche A) die Basenpaare -1 bis -950 und B) die Paare -1 bis -2650 repräsentieren.

4.5.2 *In vivo* Charakterisierung der Promotoreigenschaften der potenziell regulatorischen Sequenzen von KIAA0592

Um die Eigenschaften der potenziell regulatorischen Sequenzen von KIAA0592 zu untersuchen, wurden *in vivo* Studien zur Promotoraktivität durchgeführt. Zwei genomische Sequenzstücke stromaufwärts des ersten ATG-Codons von KIAA0592 (Abb. 4.1.2), welche die *in silico* als mögliche Promotoren identifizierten Bereiche enthielten, wurden durch PCR amplifiziert. Hierzu wurden spezifische Primer verwendet (Kap. 2.5.6). Abbildung 4.5.2 stellt schematisch die Primerbindungsstellen und damit die Größen der erhaltenen Fragmente in Bezug zu dem annotierten Promotorbereich (gelb), der 5' UTR von XM_051956 (grün) und des TSS des AK01686-Transkriptes (rot) dar.

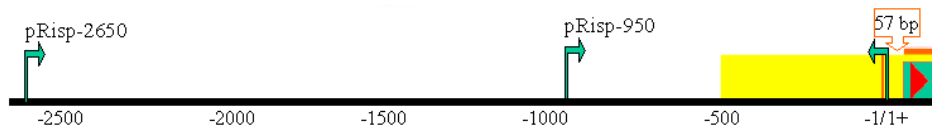


Abbildung 4.5.2: In vivo untersuchte Promotorbereiche. Übersicht der amplifizierten genomischen Sequenzen vor dem zu KIAA0592komplett (57 bp) kartierten Bereich (orange). Die Pfeile markieren die Grenzen (Primerbindungsstellen) der PCR-amplifizierten Sequenzen. Gelb ist der annotierte Promotorbereich, grün die 5'UTR von XM_051956 und rot die TSS des AK01686-Transkriptes dargestellt.

Als Matrizen für die Amplifikationen wurden das BAC RP11-324H6 und genomische DNA, die aus U87 MG-Zellen präpariert wurde, benutzt. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Matrizen sollte vermeiden, dass eine artifizielle, nur im BAC vorhandene Sequenz bearbeitet wird. Die PCR-Amplifikationen ergaben spezifische DNA-Stücke der zu erwartenden Größen von 950 und 2650 bp. Ein Sequenzvergleich der Fragmente der unterschiedlichen Quellen zeigte, dass die Sequenz des BAC identisch zur genomischen Sequenz von U87 MG ist. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit den aus U87 MG amplifizierten Genomsequenzen durchgeführt.

Untersuchungen der zellulären Expression von KIAA0592 auf mRNA- (Abb. 4.3.4) und Proteinebene (Abb. 4.4.1-2-3) hatten eine schwache Expression gezeigt, die eventuell auf eine geringe Promotoraktivität schließen lässt. Deshalb wurde als Vergleichspromotor die LTR-Sequenz des endogenen Retrovirus 3 (ERV3) ausgewählt, für die eine deutliche, jedoch schwache Promotoraktivität gezeigt werden konnte (Frech, Danescu-Mayer, and Werner, 1997).

Als Basisaktivität des promotorlosen Plasmids wurden bei der niedrigsten transfizierten Plasmidmenge (125 ng) 316 RLU/s×mg und bis zu 1831 RLU/s×mg bei der höchsten transfizierten Plasmidmenge (4000 ng) gemessen. Die einzelnen Werte sind in der Abbildung 4.5.3 dargestellt. Die gemessene Aktivität steigt mit der Menge an transfizierten promotorlosen Plasmids proportional an. Der Anstieg zeigt den direkten Zusammenhang zwischen der Menge des Luciferaseplasmids und der im Test nachgewiesenen Menge an Luciferase. Mehr Plasmid mit einer gewissen Basisaktivität sorgte für eine größere Menge an Luciferase-Protein in den Zellen, dessen enzymatische Aktivität quantitativ gemessen werden konnte. In den Versuchen mit einer Promotoraktivität lagen die Werte, wie im Folgenden beschrieben in Bereichen des 10 bis 1000fachen dieser Basisaktivität.

Alle weiteren Versuche im Rahmen dieser Experimente wurden mit ebenso ansteigenden Mengen an Plasmid durchgeführt. Unspezifische experimentelle Einflüsse sollte diese Abhängigkeit nicht zeigen und so konnten die jeweiligen Effekte auf das Reporterplasmid zurückgeführt werden.

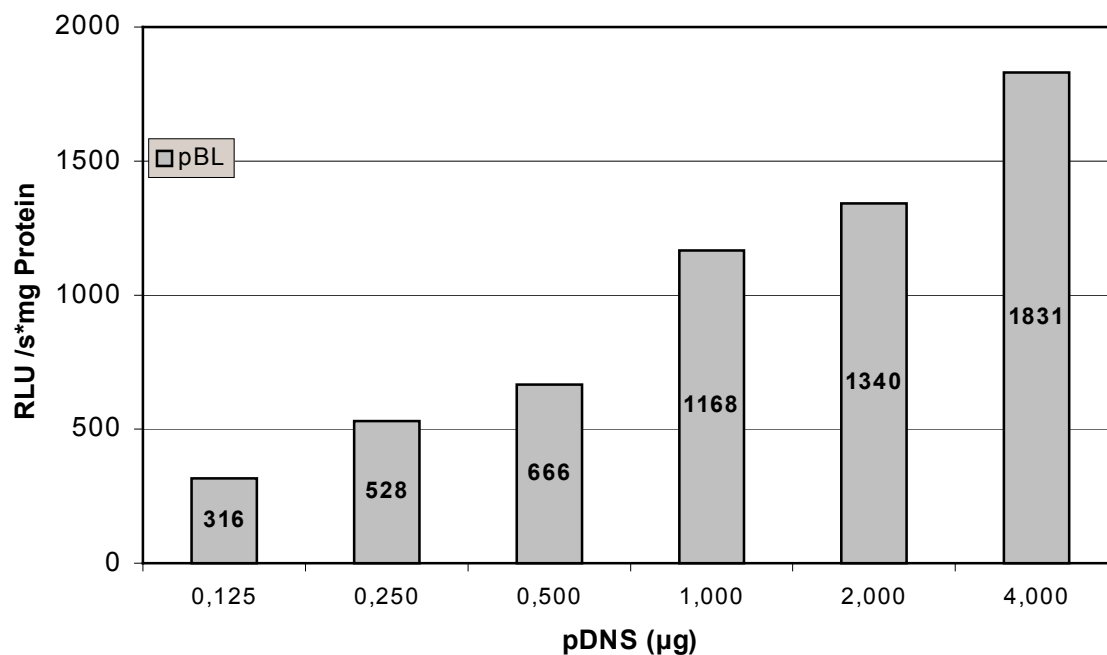


Abbildung 4.5.3: Basisexpression des Luciferasereporters des pBL-Vektors ohne zusätzliche Promotorsequenzen. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert aus zwei Messungen dar. Die Aktivität wurde aus den relativen Lichteinheiten (RLU) pro Sekunde pro mg des Gesamtproteingehalts der jeweiligen Probe ermittelt. Es wurden steigende Mengen an pBL-Plasmid (0,125 bis 4,0 µg) in U87 MG-Zellen transfiziert (1 µg Plasmid entspricht dabei 0,275 pmol).

Zur Analyse der Aktivität der C-Typ LTR des ERV3 wurden ansteigende Mengen der Luciferase-Reporterplasmide mit der LTR-Sequenz in vorwärts (+) Strangorientierung und in inverser (-) Strangorientierung in U87 MG-Zellen transfiziert. Es zeigte sich, dass die ERV3 LTR die Luciferaseexpression in U87 MG deutlich aktiviert. Schon mit geringen Mengen an Plasmid werden hohe Aktivitätswerte (155944 RLU/s×mg) gemessen. Auch die ERV3 LTR in inverser Orientierung bewirkte eine deutliche, jedoch geringere Aktivierung der Luciferasetranskription in U87 MG-Zellen. Die relativen Luciferaseaktivitäten für die verschiedenen Plasmidmengen sind in der Abbildung 4.5.4 dargestellt. Der Vergleich der relativen Luciferaseaktivität der ERV3 LTR in korrekter Orientierung mit der in inverser Orientierung zeigte eine 6-16fache Erhöhung. Wird die relative Luciferaseaktivität von der LTR dagegen mit der Aktivität

des promotorlosen Leervektors pBL verglichen, ergab sich eine deutlichere Erhöhung auf das über 2600fache (Tabelle 4.5.3).

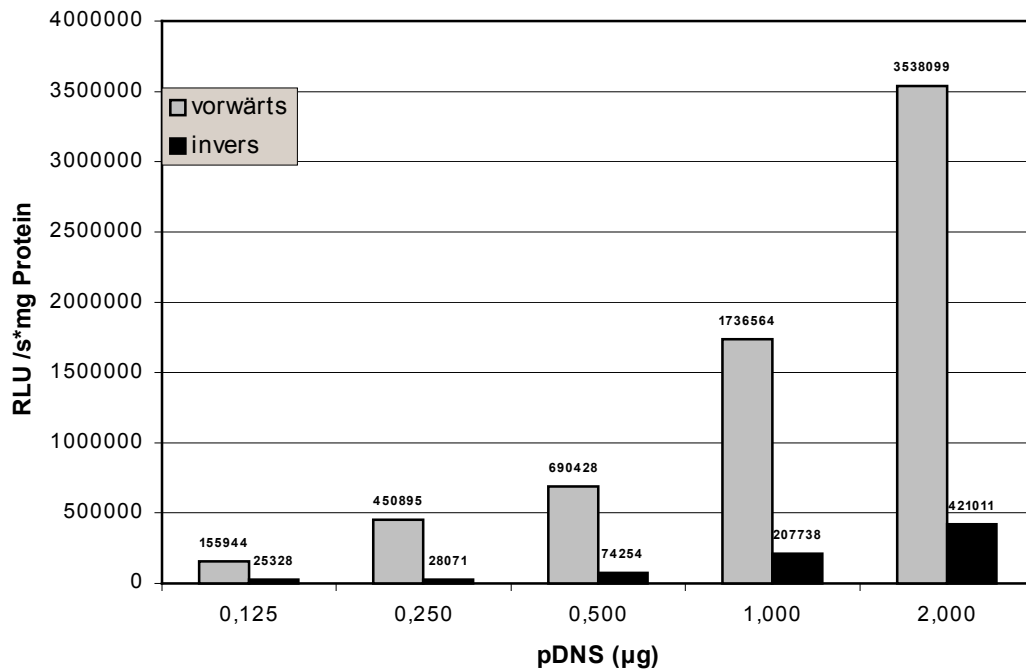


Abbildung 4.5.4: Promotoraktivität der C-Typ LTR des humanen endogenen Retrovirus 3 (ERV3) ermittelt durch die Expression des Luciferasereporters. Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivität von drei unabhängigen Experimenten des in vorwärts (+) und inverser (-) Orientierung vor dem Reportergen angeordneten Promotorbereichs in U87 MG-Zellen (1 µg Plasmid entspricht dabei 0,247 pmol).

	125ng	250ng	500ng	1µg	2µg
A. pL3-vorwärts/ pBL	494	854	1037	1487	2639
B. pL3-invers/ pBL	80	53	112	178	314
C. pL3-vorwärts/ pL3-invers	6	16	9	8	8

Tabelle 4.5.3: Relative Promotoraktivitäten der LTR des endogenen Retrovirus 3 im Vergleich mit den Kontrollen. Dargestellt ist die jeweilige Aktivität beider Orientierungen im Vergleich mit der mittleren Aktivität des Leervektors zur Detektion eines generell regulatorischen Effektes (A,B) und der Quotient der Aktivität des Promotorstückes und des inversen Stückes. Dieser Quotient (C) sollte eine orientierungsabhängige Aktivität der Promotorsequenz ermitteln. Die Werte sind auf ganze Zahlen gerundet. Die ERV3 LTR ist auch in negativer Orientierung zum Teil als Promotor aktiv (B steigt genauso wie A und der Quotient C ist gleichbleibend).

Um die Promotoraktivität des 950 bp großen Sequenzbereiches stromaufwärts des KIAA0592-Gens zu untersuchen, wurden ansteigende Mengen (125 ng bis 2 µg) des Luciferase-Reporterplasmids mit der Sequenz in korrekter (pL9-Risp) und in inverser (pL9G-Psir) Orientierung in U87 MG-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.5.5 dargestellt. Das 950 bp große Sequenzstück in korrekter Orientierung führte zu einer verstärkten Expression der Luciferase (10302-242229 RLU/s×mg).

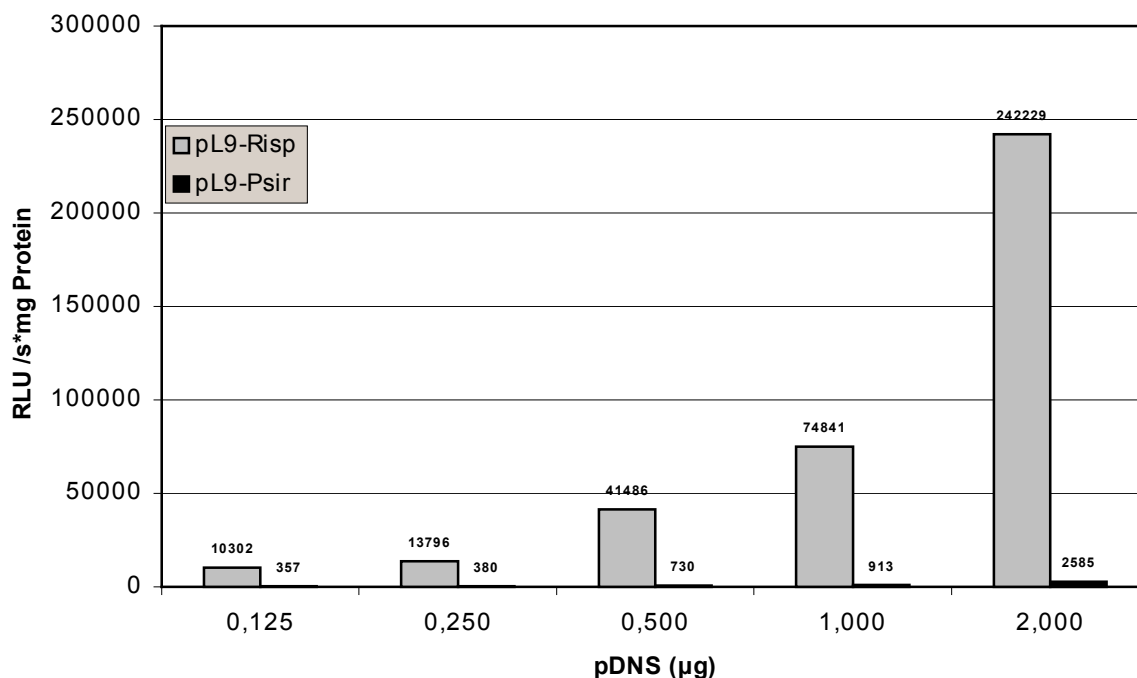


Abbildung 4.5.5: Ermittelte Promotoraktivität der 950 bp großen DNA-Sequenz stromaufwärts des KIAA0592-Gens (auf Chromosom 10) durch die Expression des Luciferasereporters. Der Bereich enthält die annotierten Promotorsequenzen (s. Tab. 4.5.1) und das Promotormodul GATA_HNF1_01 (s. Tab. 4.5.2B). Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivität von drei unabhängigen Experimenten des in positiver (Risp) und negativer (Psir) Orientierung vor dem Reportergen angeordneten 950 bp großen Sequenzbereiches (1 µg Plasmid entspricht dabei 0,235 pmol).

Die Expression war sowohl im Vergleich mit dem Leervektor (33-181fach) als auch mit dem Gegenstrangkonstrukt pL9-Psir (29-94fach) deutlich erhöht (Tab. 4.5.4). Die 950 bp stromaufwärts des KIAA0592-Gens besitzen demzufolge Promotoreigenschaften. Ein Vergleich mit der Transkriptionsaktivität der ERV3 LTR bezogen auf die Basisaktivität von pBL zeigte, dass die Promotorstärke des 950 bp großen Bereiches zwischen 14 und 20fach geringer ist.

	125ng	250ng	500ng	1µg	2µg
A. pL9-Risp/ pBL	33	26	62	64	181
B. pL9-Psir/ pBL	1	1	1	1	2
C. pL9-Risp/ pL9-Psir	29	36	57	82	94

Tabelle 4.5.4: Relative Promotoraktivität des 950 bp großen untersuchten Bereiches im Vergleich mit den Kontrollen. Dargestellt ist die jeweilige Aktivität (gerundet) beider Orientierungen im Vergleich mit der mittleren Aktivität des Leervektors zur Detektion eines generell regulatorischen Effektes der Sequenz in positiver Orientierung (A, B) und der Quotient (gerundet) der Aktivität des Promotors und der inversen Sequenz (C) zur Verdeutlichung eines orientierungsabhängigen Effektes (B bleibt gleich und C steigt an).

Um festzustellen, ob noch weitere Sequenzen stromaufwärts zur Transkriptionsaktivierung beitragen, wurde der getestete Bereich auf 2650 bp ausgeweitet. Hierzu wurden ansteigende Mengen des Luciferase-Reporterplasmids mit der Sequenz in korrekter (pL2-Risp) und in inverser (pL2G-Psir) Orientierung in U87 MG-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.5.6 dargestellt.

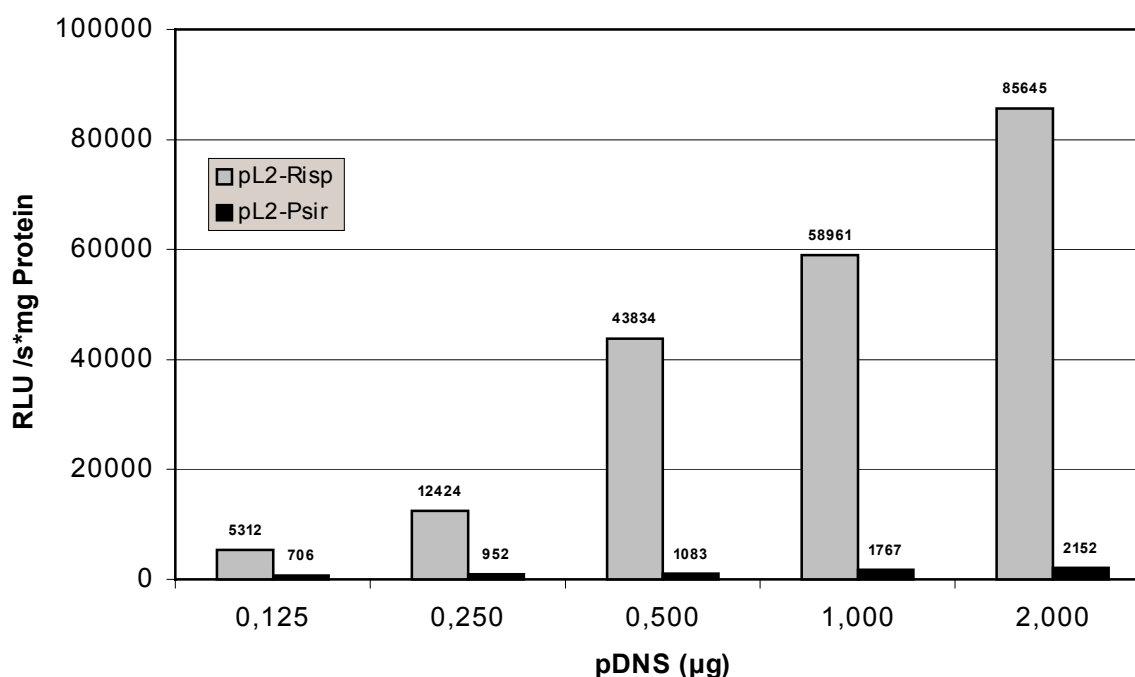


Abbildung 4.5.6: Ermittelte Promotoraktivität der 2650 bp großen DNA-Sequenz stromaufwärts des KIAA0592-Gens (auf Chromosom 10) durch die Expression des Luciferasereporters. Der Bereich enthält die annotierten Promotorsequenzen und alle ermittelten Promotormodule (Tab. 4.5.1 u 2 A-D). Gezeigt sind die Mittelwerte der Aktivität von drei unabhängigen Experimenten des in positiver (Risp) und negativer (Psir) Orientierung vor dem Reportergen angeordneten 2650 bp großen Sequenzbereiches (1 µg Plasmid entspricht dabei 0,187 pmol).

Das 2650bp große Sequenzstück führte zu einer verstärkten Expression der Luciferase (5312-85654 RLU/s×mg). Die Expression war sowohl im Vergleich mit dem Leervektor (17-64fach) als auch mit dem inversen Konstrukt (8-40fach) deutlich erhöht (Tab. 4.5.5). Ein Vergleich mit dem Effekt des 950 bp großen Sequenzstückes zeigte eine reduzierte Luciferaseexpression durch den 2650 bp großen Bereich. Durch die zusätzlichen 1700 bp wurde keine Steigerung, sondern eine bis zu 3fach geringere Aktivität erzielt.

	125ng	250ng	500ng	1µg	2µg
A pL2-Risp/ pBL	17	24	66	51	64
B pL2-Psir/ pBL	2	2	2	2	2
C pL2-Risp/ pL2-Psir	8	13	40	33	40

Tabelle 4.5.5: Relative Promotoraktivitäten des 2650 bp großen untersuchten Bereiches im Vergleich mit den Kontrollen. Dargestellt ist die jeweilige Aktivität beider Orientierungen im Vergleich mit der mittleren Aktivität des Leervektors zur Detektion eines generell regulatorischen Effektes der Sequenz in positiver Orientierung (A,B) und der Quotient der Aktivität des Promotorstückes und des inversen Stückes zur Verdeutlichung eines orientierungsabhängigen Effektes (B bleibt gleich und C steigt an). Die Werte sind auf ganze Zahlen gerundet.

Die deutlichste Promotoraktivität liegt demzufolge in einem 950 bp großen Bereich stromaufwärts des KIAA0592-Gens, in dem für andere Transkripte auch schon Promotormodule annotiert sind.

4.6 Charakterisierung der Rev-Bindung von Risp im Hefesystem

Die C-terminalen 171 Aminosäuren von KIAA0592 entsprechen der Sequenz von Risp, welche ursprünglich im Hefe 2Hybridsystem identifiziert wurde. Dem gesamten KIAA0592-Protein ist bisher keine biologische oder molekulare Funktion zugewiesen worden. Für Risp allerdings gibt es erste Hinweise für ein intrazelluläres Verhalten, welches möglicherweise auf eine Funktion von Risp als Domäne von KIAA0592 übertragen werden kann. Aus diesem Grund und durch die erschwerte Herstellung von KIAA0592-Expressionsvektoren wurden in der vorliegenden Arbeit funktionale Untersuchungen mit Risp durchgeführt.

4.6.1 Interaktionen im Hefe 2-Hybridsystem

Der Hefestamm EGY48 wurde, wie unter Kapitel 3.2.9.2 beschrieben, mit den beiden Reportergenkonstrukten sowie den die jeweiligen auf Interaktion hin zu untersuchenden Proteine kodierenden Plasmiden transformiert. Einer genaueren Untersuchung wurden die in Tabelle 4.6.1 dargestellten Plasmidpaare unterzogen.

LexA Bindungsdomäne fusioniert mit	Risp fusioniert mit Aktivierungsdomäne		Rev fusioniert mit Aktivierungsdomäne	
	<i>LacZ</i> Screen	<i>-LEU</i> Selektion	<i>LacZ</i> Screen	<i>-LEU</i> Selektion
pcRev wt	-	+++	++	+++
pcRevM4	-	+++	+++	+++
pcRevM5	-	-	-	-
pcRevSLT40	-	-	-	-
pBsRev wt	-	+++	++	+++
pBsRevM10bl	-	+++	++	+++
+++ > 500 ++ 100-500 - < 10 positive Kolonien				

Tabelle 4.6.1: Interaktionen von Risp und Rev im Hefe 2-Hybridsystem im Vergleich zur Rev:Rev-Proteinbindung. Eine Selektion von positiven Kolonien wurde auf leucindefizienten Platten nach der Fähigkeit des Wachstums und auf LacZ-Platten nach der blauen Farbe durchgeführt. Die positiven Kolonien wurden auf zwei Selektionsplatten ausgezählt und gemittelt. Die Interaktionen wurden nach der Anzahl der positiven Kolonien in verschiedene Stufen - von negative (-) bis stark (+++) – eingeteilt.

Dabei wurde das Interaktionsvermögen von Risp mit dem Wildtyp-(wt) HIV-1 Rev und verschiedenen Mutanten von Rev analysiert. Die Rev-Ausgangssequenz basierte dabei entweder auf den Sequenzen von HXB3-Rev oder auf Sequenzen des synthetischen HXB2-sRev. Die mutierten Rev-Varianten M4, M5 und SLT40 wurden auf der Basis von HXB3-Rev, die M10bl Mutante auf der Basis von sRev etabliert. Es zeigte sich, dass die Fähigkeit des Wachstums auf leucindefizienten Platten durch eine Proteininteraktion und die dadurch vermittelte Expression des Reportergens eine spezifischere Detektion erlaubte als die LacZ-Farbselektion. Als Zeichen für eine Interaktion wurde eine Kolonienzahl pro Platte von mehr als 100 festgelegt. Die durch das gleiche Prinzip der Reporteraktivierung durch Proteinbindung bewirkte Blaufärbung der Hefe-Kolonien blieb zum Teil unter der Detektionsgrenze. Somit

wurde dieses LacZ-Reportersystem als verifizierend, aber nicht allein ausreichend betrachtet. Eine Anlagerung von Rev an sich selbst, an die Rev-Mutante M4 in der Multimerisierungsdomäne I (Thomas et al., 1998) oder an die M10bl Mutante der Aktivierungsdomäne (Stauber, Gaitanaris, and Pavlakis, 1995) bewirkte eine positive Reporterantwort in beiden Systemen. Eine Interaktion von Risp mit Rev oder den Rev-Mutanten M4 und M10bl konnte durch das leucinunabhängige Wachstum identifiziert werden. Weder Rev noch Risp sind in der Lage, Rev mit der Mutation SLT40 in der Multimerisierungsdomäne II (Thomas et al., 1998) oder der M5 Mutation in der NLS/RNA-Bindungsdomäne (Malim et al., 1989) zu binden.

Es konnte gezeigt werden, dass Risp in diesem Hefesystem mit dem wildtypischen Rev interagiert. Bestimmte Motive von Rev scheinen dabei essentiell zu sein, da Mutationen in diesen Bereichen (M5, SLT40) diese Bindung ausschließen.

4.7 Charakterisierung der Rev-bindenden Eigenschaften von Risp in Säugerzellen

4.7.1 Expression der Rev- und Risp-Fusionsproteine zum Einsatz im Säuger 2-Hybridsystem

Durch Versuche im Hefesystem war Risp als neuer Interaktionspartner von HIV-1 Rev identifiziert worden. Bei Risp handelt es sich um ein menschliches Protein und Hefezellen stellen ein artifizielles System dar. Darum wurde mittels eines Säuger 2-Hybridsystems (Promega) die Interaktionen von HIV-1 Rev und Risp in menschlichen Zellen untersucht.

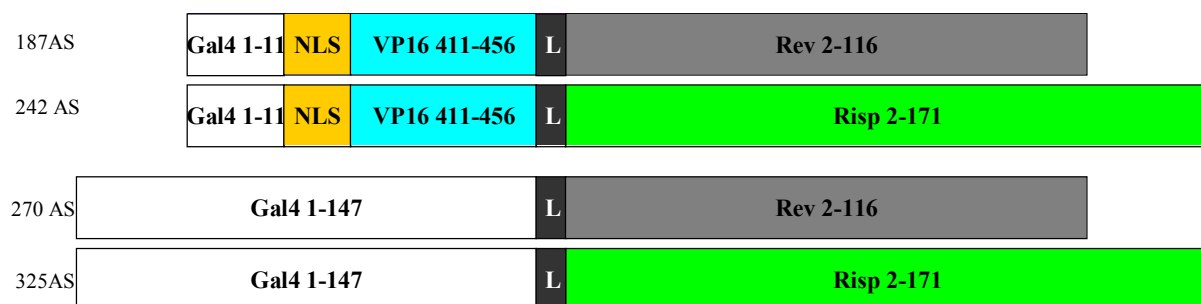


Abbildung 4.7.1: Schematische Darstellung der Fusionsproteine etabliert für den Einsatz im Checkmate™ Säuger 2-Hybridsystem. Die Größen der Proteinanteile von Gal4 (weiß), VP16 (blau), Risp (grün) und Rev (grau) sind durch die Nummerierung der Aminosäuren dargestellt. Die Position der Kernlokalisationssequenz (NLS, orange) von SV40 und einer aus 8 Aminosäuren bestehenden Verbindungssequenz (L, schwarz) ist gezeigt.

Als Zelllinie für diese Versuche wurde HEK293 ausgewählt, da die Zellen dieser Linie stark stoffwechselaktiv sind und mit hoher Effizienz ($\geq 70\%$) transient transfiziert werden können.

Es wurden Plasmide konstruiert, welche Risp und Rev als Fusionsproteine mit VP16 und Gal4 exprimieren. Diese Fusionsproteine sind schematisch in Abbildung 4.7.1 dargestellt.

Die VP16-Fusionsproteine bestanden hierbei aus den Aminosäuren 1-11 von Gal4, gefolgt von acht Aminosäuren der SV40-NLS und den Aminosäuren 411-456 der Aktivierungsdomäne des Herpes simplex VP16-Proteins, welche über ein Verbindungsstück aus acht Aminosäuren entweder mit den Aminosäuren 2-116 des HIV-1 Rev oder 2-171 von Risp fusioniert waren. Die Gal4-Fusionsproteine bestanden aus den Aminosäuren 1-147 des Gal4-Proteins, fusioniert über eine Verbindungssequenz aus acht Aminosäuren entweder mit den Aminosäuren 2-116 des HIV-1 Rev oder 2-171 von Risp.

4.7.1.1 Nachweis der Proteine im Zelllysat

Zur Kontrolle der Funktion der konstruierten Plasmide wurden die exprimierten Fusionsproteine immunologisch in Zelllysaten von HEK293-Zellen nachgewiesen. Hierzu wurden die in Tabelle 4.7.1 gelisteten Plasmide transfiziert.

Plasmid	Fusionsprotein	Errechnetes Molekulargewicht in kD	Detektiertes Molekulargewicht in kD
pBIND-Rev	Gal4-Rev	31	38-40
pBIND-Risp	Gal4-Risp	37	~ 42
pACT-Rev	VP16-Rev	21	~ 32
pACT-Risp	VP16-Risp	27	38-40
pcRev-sg143	RevGFP	40	45-55
pcRisp-sg143	RispGFP	46	45-55

Tabelle 4.7.1: Kalkulierte (MacVektor) und detektierte (s. Abb. 4.7.3) Größen der Fusionskonstrukte des Säuger 2-Hybridsystems von Rev und Risp im Vergleich mit den Kontrollproteinen RevGFP und RispGFP.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert, die Proteine der Größe nach aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Abbildung 4.7.2 zeigt zwei Western Blots, auf denen mit Risp-spezifischen oder Rev-spezifischen Antikörpern die Fusionsproteine

nachgewiesen wurden. Zur Detektion von Rev wurde der monoklonale Rev-spezifische Antikörper 8A7 aus der Maus verwendet (Abbildung 4.7.3.A). Zur Detektion von Risp wurde der monoklonale Risp-spezifische Antikörper 5D3-13211 aus der Ratte verwendet (Abbildung 4.7.2.B).

Alle Fusionsproteine konnten nachgewiesen werden. RevGFP und RispGFP zeigten Hauptbanden bei ca. 50 kDa und zusätzlich kleinere Proteinfragmente. Die im Western Blot detektierten Größen der Fusionsproteine lagen bei allen Konstrukten 5-10 kDa über den anhand der Aminosäuresequenzen errechneten Größen (MacVector). Die erwarteten Größen der Rev- und Risp-Fusionsproteine sind in Tabelle 4.7.1 Spalte 1 aufgelistet. Die im Western Blot detektierten Proteingrößen sind in Tabelle 4.7.1 Spalte 2 im Vergleich aufgelistet.

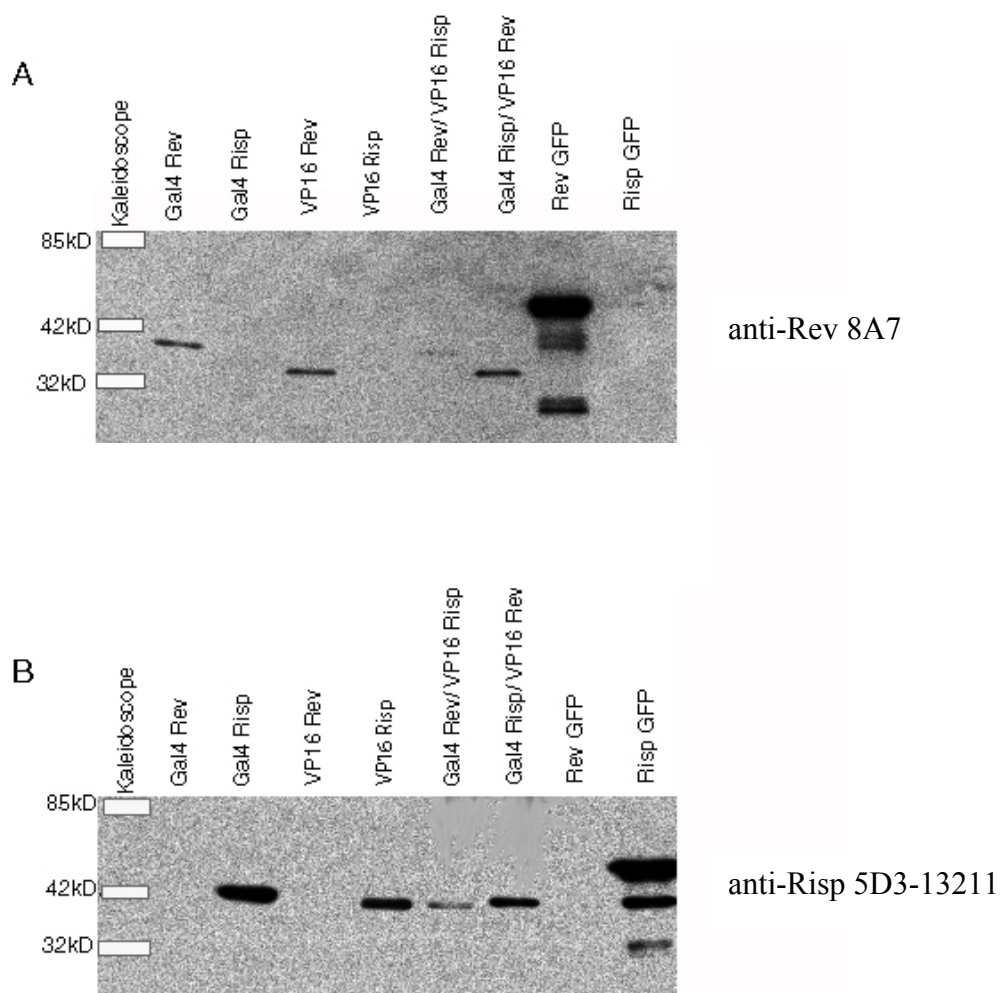


Abbildung 4.7.2: Darstellung der für den Gebrauch im Säuger 2-Hybridsystem geplanten Fusionsproteine. Die Größen der Proteine konnten anhand des Proteinstandards (erste Spur) abgelesen werden. Detektiert wurden die Fusionsproteine von Rev (A) durch den monoklonalen Maus anti-Rev 8A7 Antikörper und von Risp (B) durch den monoklonalen Ratte anti-Risp 5D3-13211 Antikörper auf einem Western Blot nach Einzel- oder Kotransfektionen der Expressionsplasmide.

Die Proteine zeigten im Vergleich untereinander die errechneten relativen Größenunterschiede. Die Fusionsproteine mit Rev sind jeweils kleiner als die entsprechenden Risp-haltigen Proteine und die VP16-Fusionsproteine sind jeweils kleiner als die mit Gal4. Die Unterschiede zu den errechneten Molekulargewichten sind durch ein abweichendes Laufverhalten der Fusionsproteine in der SDS-PAGE zu erklären. Rev migriert bei einem Molekulargewicht von 13 kDa wie ein etwa 20kDa großes Protein (Neumann, 1993), somit lässt sich auch das Laufverhalten der Rev-Fusionsproteine erklären. Risp zeigte als Fusionsprotein mit GFP (ca. 50 kDa), Gal4 (ca. 45 kDa) oder VP16 (ca. 40 kDa) ein ähnlich abweichendes Laufverhalten im Vergleich zu den errechneten Molekulargewichten (Tab. 4.7.1). Eine Koexpression der Fusionskonstrukte Gal4-Rev und VP16-Risp schien zu einer verminderten Expression beider Proteine zu führen, was auch auf eine grundsätzlich schlechtere Transfektionseffizienz zurückzuführen sein könnte. Eine Koexpression von Gal4-Risp und VP16-Rev hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression der einzelnen Proteine (Abb. 4.7.2.A und B).

4.7.1.2 Nachweis und Detektion der Risp- und Rev-Fusionsproteine in Zellen durch indirekte Immunfärbung und Fluoreszenz

Die Expression und die Lokalisation der Fusionsproteine des Säuger 2-Hybridsystems wurde untersucht um zu prüfen, ob die Fusionspartner von Risp und Rev deren Lokalisationseigenschaften beeinflussen. Hierzu wurden HeLa-Zellen transfiziert, nach 24 Stunden fixiert, permeabilisiert und mit dem Rev-spezifischen 5C6-1-1 oder dem Risp-spezifischen Antikörper 5D3-13211 (Kap. 3.1.4) aus der Ratte inkubiert. Als zweite Antikörper wurden Ratten-Immunglobulin-spezifische mit FITC konjugierte Antikörper verwendet. Als Vergleich für die Lokalisation und Expression wurden Rev- oder RispGFP exprimierende Plasmide ebenfalls in HeLa-Zellen transfiziert und die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins detektiert.

Abbildung 4.7.3 zeigt jeweils ein Phasenkontrastbild und ein Bild der grünen Fluoreszenz der Fusionsproteine. RevGFP ist deutlich im Nukleus bzw. den Nukleoli der HeLa-Zellen akkumuliert (A), wohingegen RispGFP im Zytoplasma akkumuliert, aber ebenfalls im Kern (B) verteilt ist.

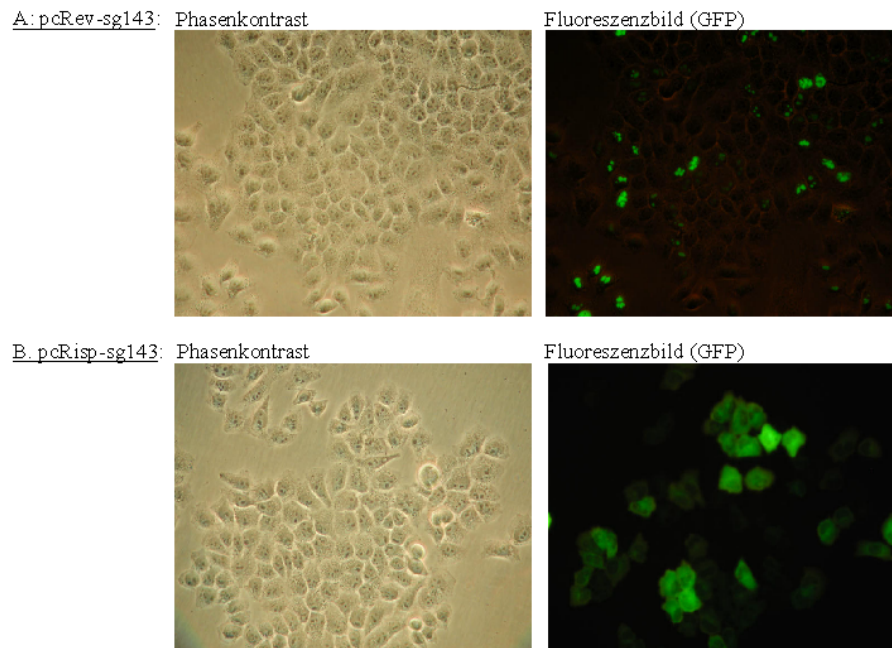


Abbildung 4.7.3: Expression und Lokalisation von RevGFP (A) im Vergleich zu RispGFP (B) in HeLa-Zellen nach Transfektion der Expressionsplasmide. Das Risp-Fusionsprotein zeigt sich vorwiegend im Zytoplasma, das Rev-Fusionsprotein im Kern bzw. den Nukleoli (32x Objektiv).

Nach Transfektion mit dem Expressionsplasmid pACT-Rev konnte durch den Rev-spezifischen Antikörper die Expression von VP16-Rev (Abb. 4.7.4 A) gezeigt werden. Das VP16-Rev-Protein konnte im Vergleich mit dem RevGFP-Protein ebenso im Zellkern detektiert werden. Im Gegensatz hierzu konnte die Expression von Gal4-Rev (Abb. 4.7.4 B) durch das transfizierte Plasmid pBIND-Rev vorwiegend im Zytoplasma gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zur im selben Experiment mitgeführten RevGFP-Kontrolltransfektion sowie schon publizierten Daten über nukleäre Lokalisation von Rev in HeLa-Zellen (Neumann et al., 1995).

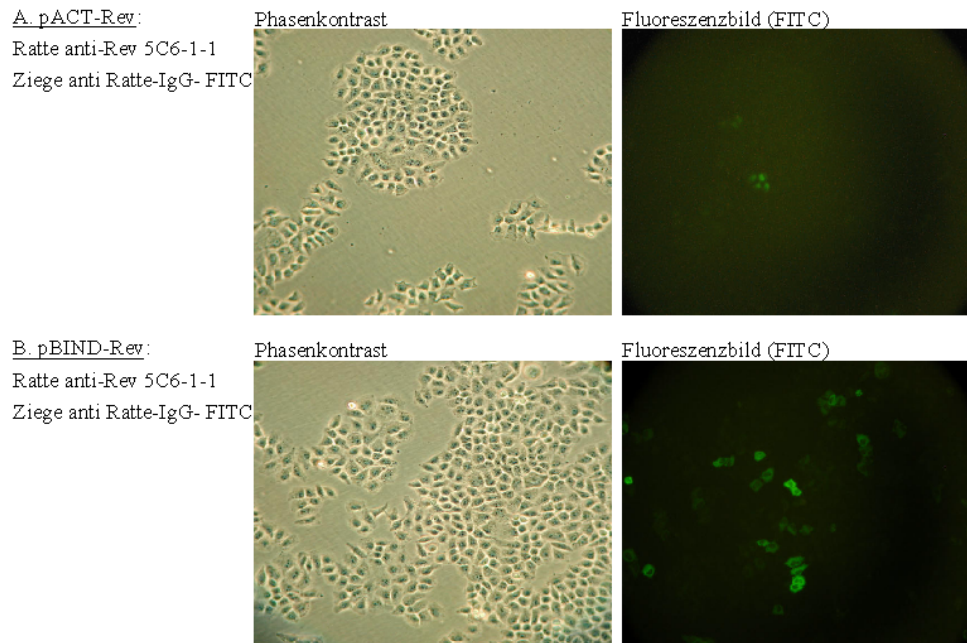


Abbildung 4.7.4: Indirekte Immunfärbungen von HeLa-Zellen. Zur Detektion (20x Objektiv) der Produkte eines transfizierten VP16-Rev-exprimierenden Plasmids (A. pACT-Rev) oder eines Gal4-Rev-exprimierenden Plasmids (B. pBIND-Rev) wurde die Antikörperkombination eines monoklonalen Ratte anti-Rev 5C6-1-1 und eines FITC-gekoppelten Ziege anti-Ratte Antikörpers verwendet.

In Abbildung 4.7.5A ist gezeigt, dass nach einer Transfektion mit pACT-Risp das Fusionsprotein VP16-Risp durch einen Risp-spezifischen Antikörper vorwiegend zytoplasmatisch nachgewiesen werden konnte. Es zeigten sich jedoch auch deutliche Anteile im Kern. Die Expression von Gal4-Risp (Abb. 4.7.5B) konnte ebenfalls vorwiegend in Zytoplasma gezeigt werden, mit teilweiser Lokalisation im Kern. Die zusätzliche Sequenz der SV40-NLS zu VP16 oder die Fähigkeit des Gal4-Proteinanteils an sich zum Import in der Kern (Chan and Kim, 1998) hatten keinen Kernimporteffekt auf die Lokalisation der Fusionskonstrukte im Vergleich zu GFP-Fusionsproteinen. Risp blieb auch im Zusammenhang dieser Fusionsproteine im Zytoplasma akkumuliert, Rev hingegen lokalisierte im Kontext mit Gal4 sogar ebenfalls zytoplasmatisch, im Kontext mit VP16 im Kern.

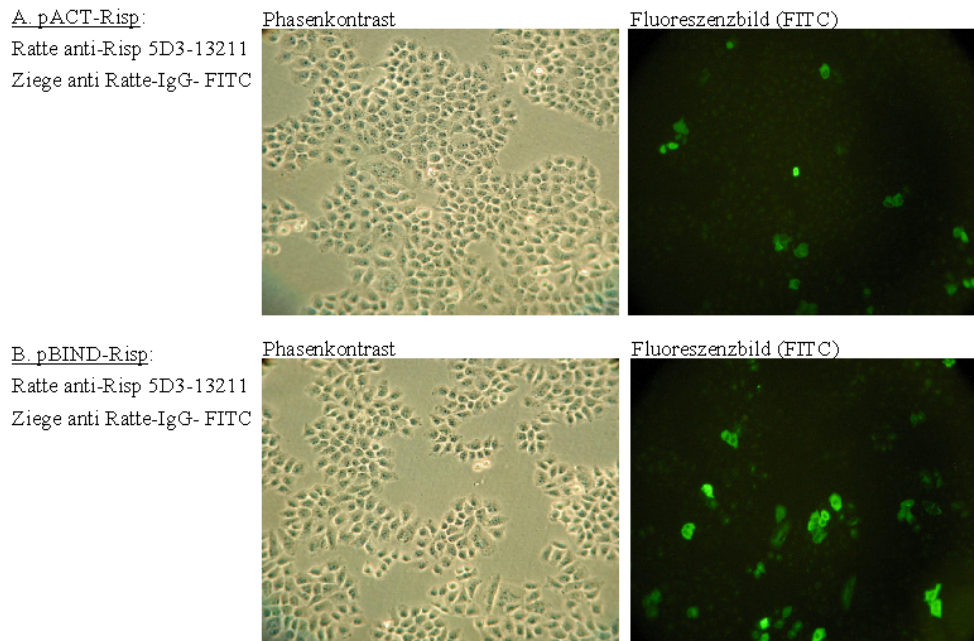


Abbildung 4.7.5: Indirekte Immunfärbungen von HeLa-Zellen. Zur Detektion (20x Objektiv) der Produkte eines transfizierten VP16-Risp-exprimierenden Plasmids (A. pACT-Risp) oder eines Gal4-Risp-exprimierenden Plasmids (B. pBIND-Risp) wurde die Antikörperkombination eines monoklonalen Ratte anti-Risp 5D3-13211 und eines FITC-gekoppelten Ziege anti-Ratte Antikörpers verwendet.

Um einen möglichen Einfluss einer Kotretransfektion auf die Expression und Lokalisation der einzelnen Fusionskonstrukte zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide für VP16-Rev und Gal4-Risp oder Gal4-Rev und VP16-Risp zusammen transfiziert. Die Koexpressionen sind in Abbildung 4.7.6 dargestellt. Jeweils beide Fusionsproteine von Rev und Risp ließen sich immunologisch mit dem Risp-spezifischen Antikörper 5D3-13211 oder dem Rev-spezifischen Antikörper 5C6-1-1 nachweisen. Dabei zeigten sich keine Veränderungen in der Stärke der Expression oder in der Lokalisation. Die Fusionsproteine Gal4-Risp (Abb. 4.7.6A1) und VP16-Risp (B1) sowie Gal4-Rev (B2) lokalisieren vornehmlich im Zytoplasma, wohingegen VP16-Rev (Abb. 4.7.6A2) im Kern akkumuliert.

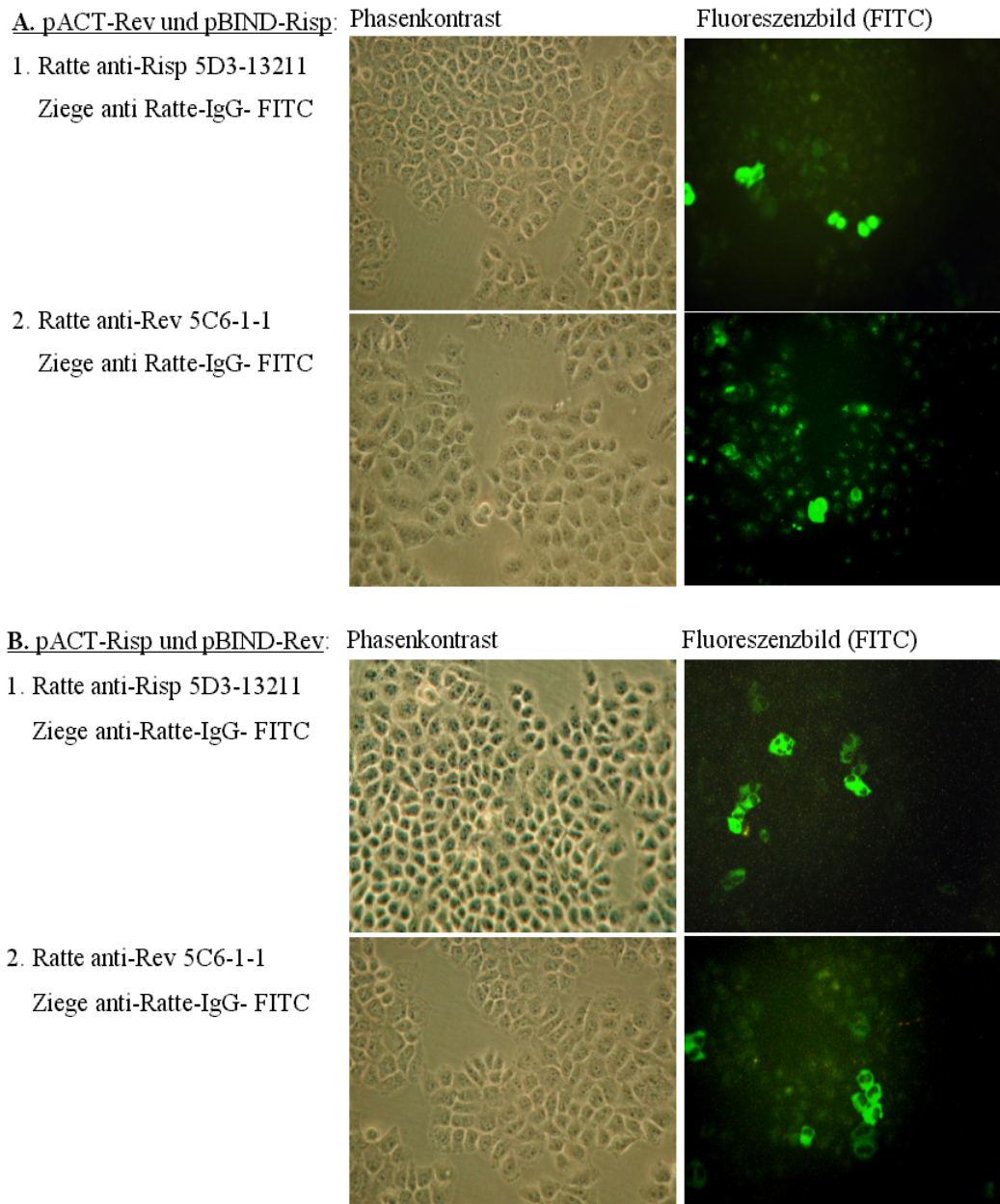


Abbildung 4.7.6: Indirekte Immunfärbungen von HeLa-Zellen. Zur Detektion der Produkte der kotransfizierten VP16-Rev und Gal4-Risp exprimierenden Plasmide (A) oder der kotransfizierten VP16-Risp und Gal4-Rev exprimierenden Plasmide (B) wurden folgende Antikörperkombination verwendet: ein monoklonaler Ratte anti-Risp 5D3-13211 (A1 und B1) oder ein monoklonaler Ratte anti-Rev 5C6-1-1 (A2 und B2) und ein FITC-gekoppelter Ziege anti-Ratte Antikörper.

Die Rev- und Risp-Fusionsproteine des Säugersystems ließen sich exprimieren und ihre intrazelluläre Lokalisation bestimmen. Die Fusionsproteine zeigten nur teilweise eine nukleäre Lokalisation. Ein Kernlokalisierungseffekt durch die Fusionskomponenten des 2-Hybridsystems (VP16, Gal4) konnte nicht gezeigt werden.

Die Lokalisation der Säuger 2-Hybridfusionsproteine ist in Tabelle 4.7.2 zusammengefasst.

Fusionsprotein:	Lokalisation:
VP16-Rev	nukleär
Gal4-Rev	zytoplasmatisch
VP16-Risp	zytoplasmatisch
Gal4-Risp	nukleär u. zytoplasmatisch

Tabelle 4.7.2: Zusammenfassung der Lokalisationen der Fusionsproteine des Säuger 2-Hybridsystems von Risp und Rev.

4.7.2 Funktionsanalysen der Rev-Fusionsproteine des Säuger 2-Hybridsystems

Um festzustellen, ob die erstellten Fusionsproteine von Rev die RNA-Bindungs- und RNA-Exporteigenschaften des unfusionierten Rev besitzen, wurden Funktionsversuche durchgeführt. Hierfür wurde das System der Rev- und Tat-abhängigen Expression des *DsRed* Reporterproteins (Wolff, 2003) herangezogen. HeLaTat-Zellen wurden mit identischen Mengen der Expressionsplasmide für RevGFP, VP16-Rev und Gal4-Rev sowie des Reporterplasmids pLRedINS-R transient transfiziert. Diese Proteine wurden dadurch auf ihre Rev-spezifische Funktion getestet. Als Negativkontrolle wurde ein GFP-Expressionsplasmid verwendet. Rev-Funktionalität führt zur Expression des rot-fluoreszierenden Reporterproteins.

Zur Kontrolle der Transfektion und zur Detektion der transfizierten Zellen wurden zusätzlich zu VP16-Rev und Gal4-Rev GFP exprimiert. Es konnte somit in allen Ansätzen in GFP-exprimierenden Zellen die Expression von *DsRed* ermittelt werden. Hierzu wurden an einem inversen Mikroskop Bilder des Phasenkontrastes und der grünen und der roten Fluoreszenzwellenlängen aufgenommen. Die Ergebnisse der Rev-Funktionsuntersuchungen sind in Abbildung 4.7.7 gezeigt.

Die Expression von RevGFP (A) führte zu einer effizienten Expression des Rev-abhängigen *DsRed*-Reporters. Die GFP-Expression (B) alleine hat keine Bildung des *DsRed*-Proteins zur Folge. Die Rev-Fusionsproteine VP16-Rev (C) und Gal4-Rev (D) waren in der Lage, die Expression des Rev-abhängigen Reporters zu aktivieren. In allen Ansätzen konnte eine vergleichbare Expression von GFP bzw. RevGFP festgestellt werden. Daraus ließ sich schließen, dass VP16-Rev und Gal4-Rev in ähnlichem Maße wie RevGFP funktional sind. Dadurch sollte verhindert werden, dass

eine Interaktion direkt durch das Fehlen der Funktion der Fusionskonstrukte von Rev begründet ist.

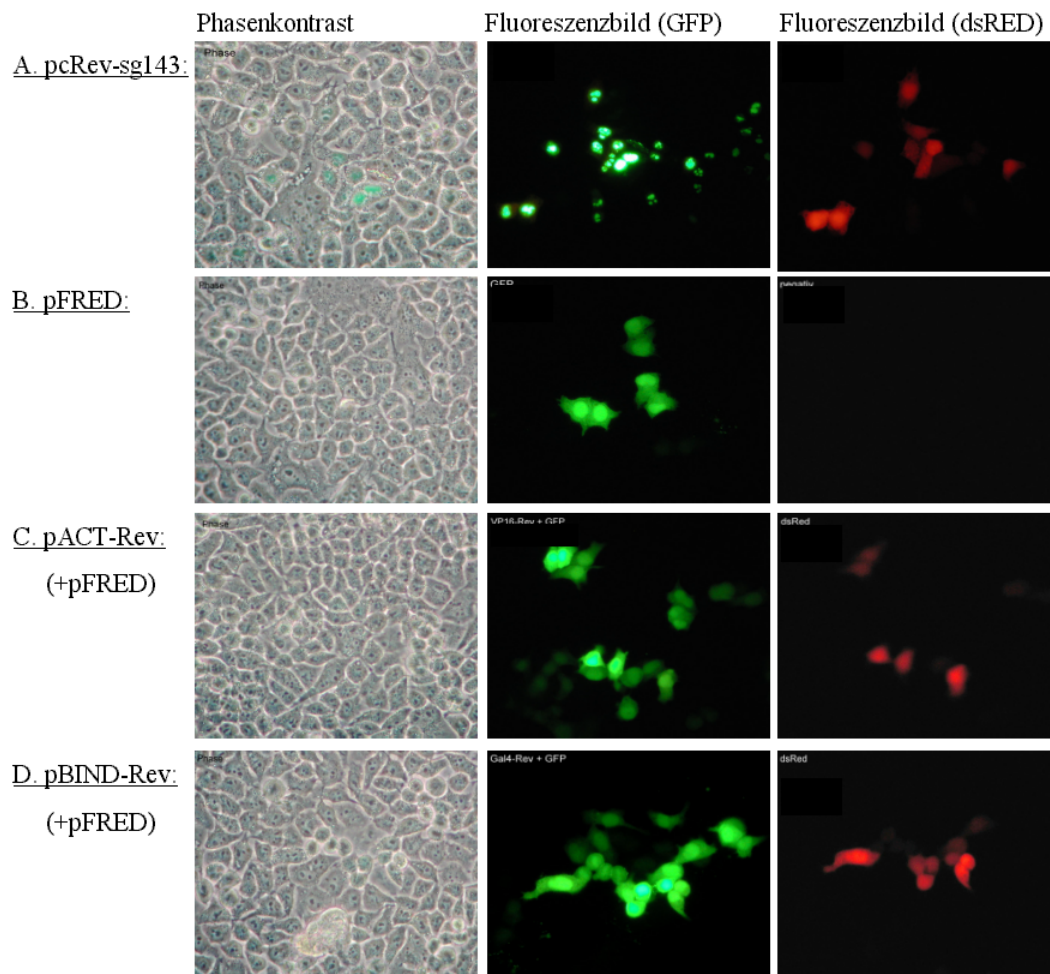


Abbildung 4.7.7: Nachweis der Funktionalität der Rev-Fusionsproteine, die im Säuger 2-Hybridsystem verwendet werden. Expression des von funktionalem Rev-abhängigen *DsRed* durch Rev-GFP(A) und den Rev-Fusionskonstrukten des Säuger 2-Hybridsystems VP16-Rev (C) und Gal4-Rev (D) im Vergleich zu GFP (B), das keinen aktivierenden Einfluss auf die Expression ausübt. Gezeigt sind die Phasenkontrastbilder der untersuchten Zellen, die grüne Fluoreszenz von RevGFP und GFP (in C und D kotransfiziert) und die rote Fluoreszenz des exprimierten *DsRed*.

4.7.3 Interaktion von Rev und Risp im Säuger 2-Hybridsystem

Es wurden HEK293-Zellen mit Expressionsplasmiden transient transfiziert. Um auszuschließen, dass weder die VP16 noch die Gal4 Domänen selbst an einen der Interaktionspartner binden, wurden Kontrollversuche ohne fusionierte Interaktionspartner jeweils parallel durchgeführt. Nach Auskunft des Herstellers (Promega) bindet das azide Protein VP16 alleine an basischen Sequenzen. Rev hat

stark basische Eigenschaften ($pI=9,9$) und deshalb wäre eine Bindung oder Interferenz mit nur dem VP16-Proteinanteil zu erwarten. In Vorversuchen konnten solche Interferenzen tatsächlich beobachtet werden. Auf Grund dessen und wegen der ungewöhnlichen zytoplasmatischen Lokalisation des Gal4-Rev-Proteins wurden keine Versuche mit Gal4-Rev und VP16-Risp als Interaktionspartner durchgeführt.

In den Interaktionsexperimenten wurden die Werte der relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) 48 h nach der Transfektion ermittelt und standardisiert und auf den Basiswert der Negativkontrollen bezogen (Kap. 3.3.4). Abbildung 4.7.8 zeigt die Basisinduktion (= 1x) der Negativkontrollen VP16 und Gal4 und im Vergleich die Induktion der Positivkontrollen des Systems VP16-MyoD und Gal4-Id. Diese Positivkontrollen führten zu einer durchschnittlich 300fachen Induktion.

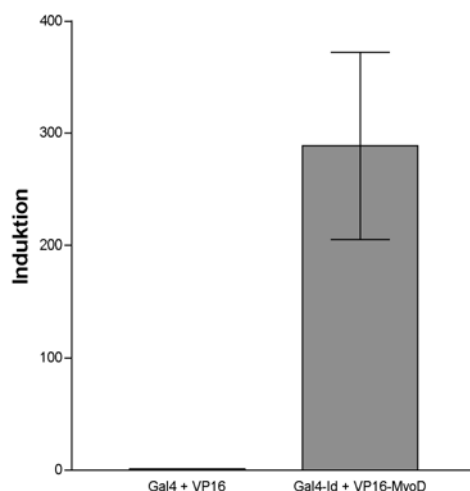


Abbildung 4.7.8: Induktion der Luciferaseexpression durch die Interaktion der Positivkontrollen VP16-MyoD und Gal4-Id im Vergleich zu unfusionierten VP16- und Gal4-Proteinanteilen als Vergleichsgröße der Induktion. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

Zur Bestimmung der Rev-Risp-Interaktion wurden folgende Interaktionspaare untersucht und verglichen:

- | | | |
|-------------|-----|----------|
| • Gal4-Risp | mit | VP16-Rev |
| • Gal4-Risp | mit | VP16 |
| • Gal4 | mit | VP16-Rev |
| • VP16 | mit | Gal4 |

Die Ergebnisse der Interaktion von Rev und Risp sind in Abbildung 4.7.9 dargestellt. Die Anzahl der Versuche (n), der Mittelwert (MW) der Versuche und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM als Fehlerbalken) sind für die Interaktionen angegeben.

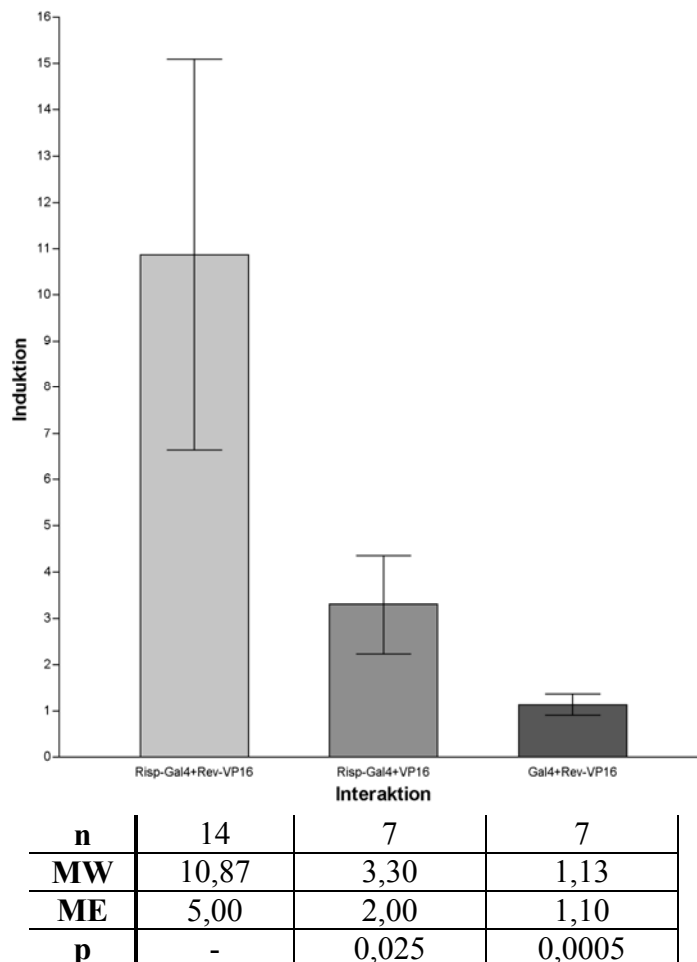


Abbildung 4.7.9: Interaktion von Gal4-Risp und VP16-Rev. Induktion der Reportergenexpression durch die Interaktion im Säuger 2-Hybridsystem im Vergleich zu den Kontrollen Gal4-Risp mit VP16 alleine und VP16 Rev mit Gal4 alleine. n stellt die Anzahl der Versuche dar, MW ist der Mittelwert dieser Versuche (Balken), ME der Median der Versuche und p die statistische Signifikanz des Unterschieds des Interaktionspaares VP16-Rev:Gal4-Risp zu den Kontrollen. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

In 14 Experimenten zeigte sich eine mittlere Induktion der Reporterexpression von 10,87 für die Interaktion von Gal4-Risp:VP16-Rev. In jeweils sieben Versuchen zeigte sich eine mittlere Induktion von 3,30 für die Interaktion der Gal4-Risp:VP16-Kontrolle und von 1,13 für die Gal4:VP16-Rev-Kontrolle. Zur Analyse der Versuchsergebnisse wurde der p-Wert nach Mann-Whitney als statistische Signifikanz der Unterschiede errechnet (Prism für Macintosh 2.0). Ein p-Wert unter 0,05 ist ein Zeichen für einen

statistisch signifikanten Unterschied. Die Versuchsergebnisse der Bindung von Gal4-Risp:VP16-Rev waren mit einem p-Wert von 0,025 gegenüber der Kontrolle Gal4-Risp:VP16 und $p=0,0005$ gegenüber der Kontrolle Gal4:VP16-Rev als signifikant einzuordnen. Diese Versuche zeigten, dass zwischen den Fusionsproteinen von Rev und Risp in dem Säuger 2-Hybridsystem eine Bindung entstand.

Risp bindet in menschlichen HEK293-Zellen an HIV-1 Rev. Durch eine eindeutige Induktion der Reporterexpression, welche signifikant höher als bei den Kontrollexperimenten lag, konnte dies gezeigt werden.

4.8 Identifizierung der Dimerisierungseigenschaften von Risp im Säuger 2-Hybridsystem

Mit dem Säuger 2-Hybridsystem wurde nach einer möglichen Interaktion von Risp mit sich selbst, also einer Dimerisierung oder Multimerisierung gesucht. Dazu wurden die Expressionsplasmide von Gal4-Risp und VP16-Risp und das Luciferase-Reporterplasmid (pG5luc) transient in HEK293-Zellen transfiziert. Die ermittelten Induktionen der Interaktionen sind in Abbildung 4.8.1 dargestellt. In sechs Versuchen wurde für die Interaktion Gal4-Risp:VP16-Risp eine mittlere Induktion der Reporterexpression von 11,98 ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle Gal4-Risp:VP16 in sieben Versuchen eine mittlere Induktion von 3,30. Zur Analyse der Versuchsergebnisse wurde der p-Wert nach Mann-Whitney als Zeichen der statistischen Signifikanz der Unterschiede errechnet. Die Interaktion von Gal4-Risp:VP16-Risp zeigte einen p-Wert von 0,035 gegenüber der Kontrolle Gal4-Risp:VP16. Die signifikant unterschiedlichen Werte der Probe und der Kontrolle zeigten, dass sich aus den Risp-Fusionsproteinen in dieser Versuchsanordnung mindestens ein Dimer bildete.

Die Risp-Aminosäuresequenz, welche einen Teil des KIAA0592komplett-Proteins darstellt, ist in der Lage, mit einem zweiten Risp-Molekül intermolekular zu interagieren, also Homomere zu bilden. Falls der dafür nötige Bereich nicht durch Sekundärstrukturen verdeckt wird, ist diese Fähigkeit auch von KIAA0592komplett zu erwarten.

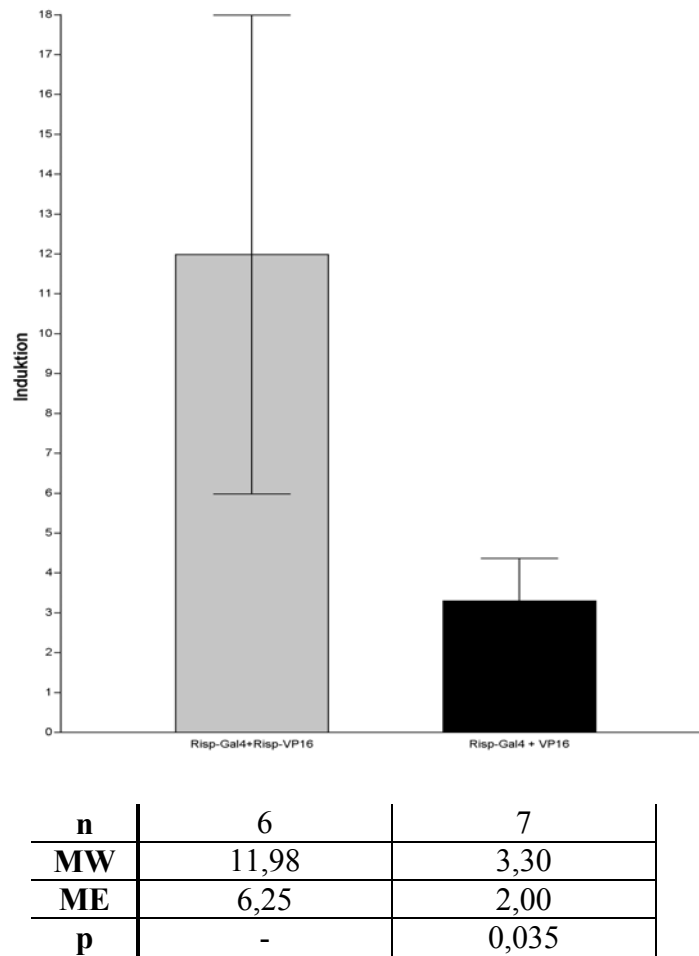
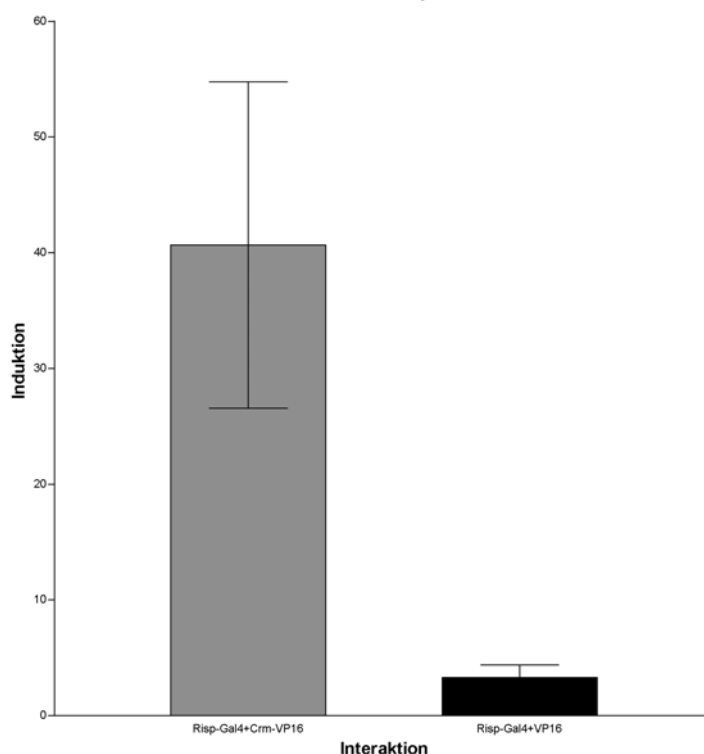


Abbildung 4.8.1: Dimerbildung von Gal4-Risp und VP16-Risp. Induktion der Reportergenexpression durch die Interaktion im Säuger 2-Hybridsystem im Vergleich mit der Kontrolle Gal4-Risp mit VP16 alleine. n stellt die Anzahl der Versuche dar, MW ist der Mittelwert dieser Versuche (Balken), ME der Median der Versuche und p die statistische Signifikanz des Unterschieds des Interaktionspaares VP16-Risp und Gal4-Risp zu der Kontrolle. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

4.9 Charakterisierung der Crm1-Bindung von Risp im Säuger 2-Hybridsystem

Für Risp ist gezeigt, dass es in der Lage ist, aus dem Kern exportiert zu werden (Ceccherini-Silberstein, 2001). Erste Versuche der Blockade der Crm1-Kernexportfunktion durch Leptomycin B hatten Hinweise auf ein Abhängigkeit von Risp zu Crm1 gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Risp in menschlichen Zellen direkt an Crm1 bindet. Hierzu wurden die Expressionsplasmide von Gal4-Risp und VP16-Crm1 und das Luciferase-Reporterplasmid (pG5luc) transient in HEK293-Zellen transfiziert und nach 48 Stunden die Aktivität der

exprimierten Luciferase sowie die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Die ermittelten Induktionen der Interaktionen sind in Abbildung 4.9.1 dargestellt.



n	7	7
MW	40,66	3,30
ME	21,70	2,00
p		0,0006

Abbildung 4.9.1: Interaktion von Gal4-Risp mit VP16-Crm1. Induktion der Reportergenexpression durch die Interaktion im Säuger 2-Hybridsystem im Vergleich mit der Kontrolle Gal4-Risp mit VP16 alleine. n stellt die Anzahl der Versuche dar, MW ist der Mittelwert dieser Versuche (Balken), ME der Median der Versuche und p die statistische Signifikanz des Unterschieds des Interaktionspaares VP16-Crm1 und Gal4-Risp zu der Kontrolle. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

Die gemessene Induktion des Reporterkonstruktes durch die Bindung von Gal4-Risp:VP16-Crm1 konnte eindeutig eine Interaktion zeigen. Die Induktion mit einem Mittelwert von 40,66 in 7 Versuchen ist signifikant ($p=0,0006$) im Vergleich zu der Kontrollreaktion Gal4-Risp:VP16 mit einem Mittelwert von 3,3.

Risp ist in der Lage eine direkte Verbindung mit dem Kernexportprotein Crm1 einzugehen. Ob die Crm1-Bindung in einem Zusammenhang mit der intrazellulären Lokalisation steht, wurde unter Berücksichtigung der Lokalisationseigenschaften des Risp-Proteins untersucht.

4.10 Lokalisationseigenschaften von Risp

Risp stellt ein Rev-bindendes Protein dar. Rev liegt in HeLa-Zellen vornehmlich im Nukleus und dort vor allem in den Nukleoli vor. Diese Lokalisation ist wichtig für die Funktion von Rev (Neumann et al., 1995). Es ist von Interesse, das Lokalisationsverhalten von Risp im Vergleich zu und im Zusammenhang mit Rev in diesen Zellen zu untersuchen. Wichtig für die Funktion von Rev ist die Fähigkeit, zwischen dem Kern und dem Zytoplasma zu pendeln. Es wurde publiziert, dass unabhängig von der Herkunft eines nukleären Exportsignals, das mit dem N-terminalen Teil eines C-terminal deletierten Rev fusioniert ist, ein funktionsfähiges Rev entsteht (Yi, Bogerd, and Cullen, 2002; Yi et al., 2002). Für die gesamten 171 AS von Risp wurde die Fähigkeit zur Bindung an Crm1 gezeigt und Versuche mit Leptomycin B (LMB) ließen ein Crm1 abhängiges Lokalisationsverhalten erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Lokalisationseigenschaften von Risp, im Besonderen die Fähigkeit des Exports aus dem Kern, im Vergleich mit dem gesamten Rev und im direkten Zusammenhang mit der Kernimportfähigkeit von Rev (AS 1-54) verhält.

Es wurden verschiedene Proteine exprimiert, um das räumliche Verhalten von Rev und Risp, des N-terminalen Teils (AS 1-54) von Rev oder des Fusionsproteins der N-terminalen 54 Aminosäuren von Rev mit Risp zu untersuchen. Zur Detektion diente jeweils ein C-terminal fusioniertes GFP, welches im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden konnte. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 h fixiert. Diese Fixierung diente dazu, eine Momentaufnahme des Lokalisationsstatus anzufertigen, wodurch verschiedene Konstrukte ohne zeitliche Differenz unter den gleichen Voraussetzungen betrachtet werden konnten. Von jedem zu untersuchenden Konstrukt wurden jeweils drei verschiedene Bilder aufgenommen: GFP-Fluoreszenz, Phasenkontrast und die Fluoreszenz der Kernfärbung.

Durch das Programm IPLab konnte der prozentuale Anteil der Gesamtfluoreszenz im Kern errechnet werden (Neumann et al., 2001).

4.10.1 Lokalisationen der Risp-Fusionskonstrukte mit einem GFP unter Einfluss von Leptomycin B

Zur Untersuchung der Lokalisationseigenschaften wurden HeLa-Zellen transfiziert, inkubiert, fixiert und gefärbt. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Lokalisation der fluoreszierenden Proteine quantifiziert. Die untersuchten Proteine waren folgende:

- GFP
- RispGFP
- RevGFP
- Rev1-54RispGFP
- Rev1-54GFP

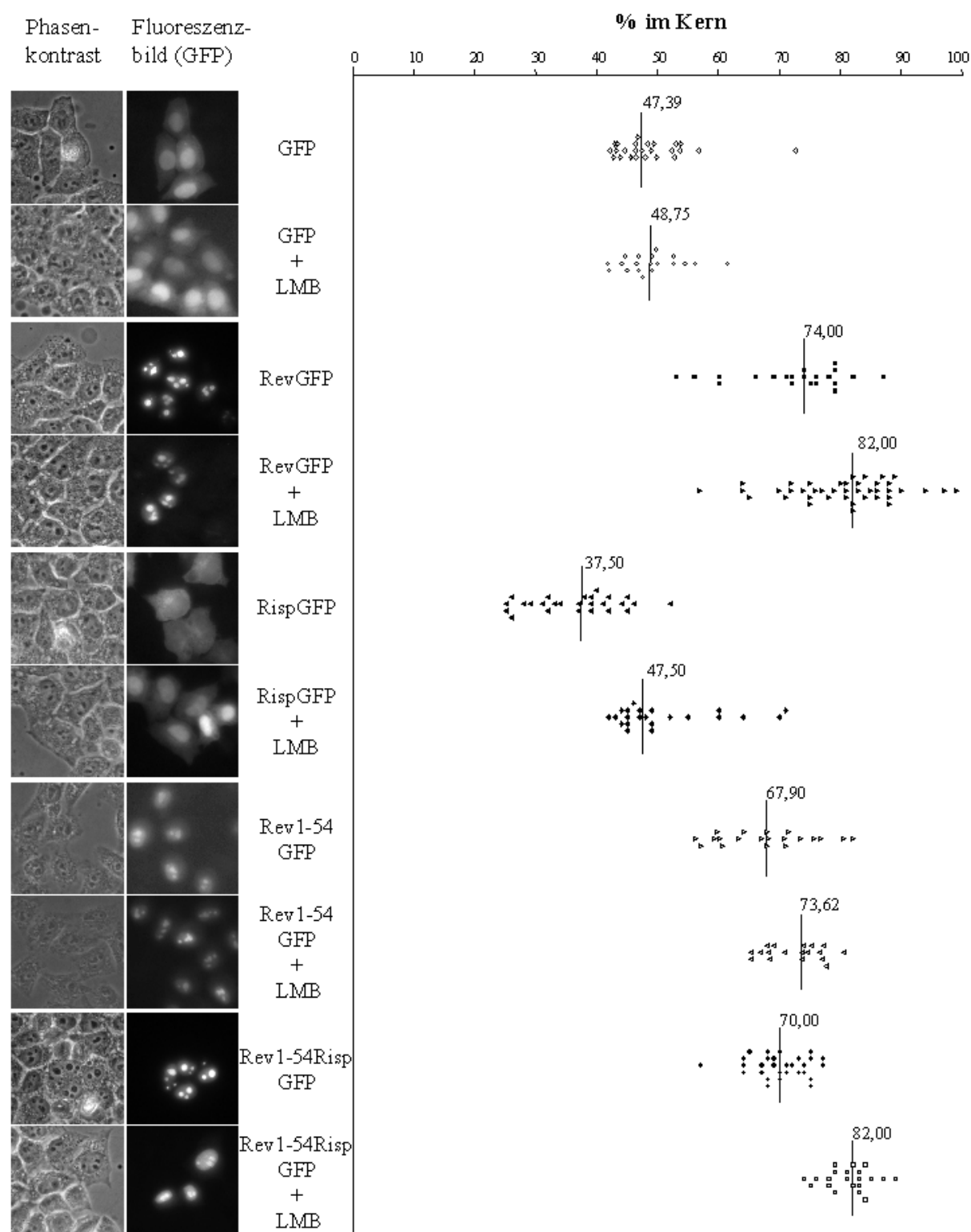


Abbildung 4.10.1: Lokalisationsverhalten von GFP, RevGFP, RispGFP, Rev1-54GFP und Rev1-54RispGFP mit und ohne Leptomycin B-Behandlung in HeLa-Zellen. Die Abbildung zeigt die einzelnen quantifizierten Zellen und den Median einer Population. Zusätzlich sind jeweils parallel zu den ausgewerteten Zellpopulationen beispielhafte Bilder der quantifizierten Zellen im Phasenkontrast und Fluoreszenzbild des GFP-Anteils gezeigt.

In Abbildung 4.10.1 sind die Ergebnisse der Quantifikationen des nukleären Anteils der Fluoreszenz der Zellen graphisch gezeigt. Jeweils ein Bild (Phasenkontrast und Fluoreszenz) der Lokalisation der verschiedenen Fusionsproteine ist gezeigt. Leptomycin B verhindert durch eine kovalente Bindung an Crm1 den durch Crm1 vermittelten Kernexport von NES-enhaltenden Proteinen wie z.B. Rev (Kudo et al., 1998; Wolff, Sanglier, and Wang, 1997).

GFP lokalisierte unabhängig von der Behandlung mit LMB gleichverteilt im Zytoplasma und im Zellkern. RevGFP hingegen zeigte eine deutliche Akkumulation von 74 % der Fluoreszenz im Kern. Durch eine spezifische Hemmung des Crm1 vermittelten Kernexports durch LMB wurde diese noch gesteigert (82 %). RispGFP lokalisiert im Gegensatz zu Rev vorwiegend im Zytoplasma (38 % im Kern). Durch eine Hemmung des Crm1-vermittelten Kernexports wurde eine vermehrt nukleäre Lokalisation (48 % im Kern) beobachtet. Der N-terminale Teil von Rev (AS 1-54) mit GFP war vorwiegend im Kern zu finden (68 %), lokalisierte dort aber weniger als RevGFP. Das Fusionskonstrukt von Rev1-54Risp mit GFP zeigte eine vermehrt nukleäre Lokalisation (70 %). Eine Behandlung mit LMB führte bei diesem Fusionskonstrukt ebenso zu einer verstärkten nukleären Akkumulation (82 %). Die Verstärkung der Akkumulation im Kern um 12 % durch die Exporthemmung lag bei dem Rev1-54Risp-Fusionskonstrukt höher als bei RevGFP (8 %). Der zusätzliche Risp-Anteil des Fusionskonstruktes Rev1-54Risp führte also zur gleichen Akkumulation nach einer Leptomycin B Behandlung wie bei RevGFP und zu einer höheren Kernakkumulation wie bei Rev1-54GFP.

Statistische Analysen (Mann-Whitney Test) zeigten, dass die Unterschiede der Lokalisation von Rev- und Risp-Proteinen, jeweils in LMB-behandelten zu LMB-unbehandelten Zellen statistisch signifikant waren ($p < 0,05$). Leptomycin B hatte durch die Hemmung des Crm1-spezifischen Exports einen Einfluss auf die Lokalisation aller verwendeten Rev- oder Risp-Proteine.

RispGFP lokalisiert überwiegend im Zytoplasma von HeLa-Zellen, ca. 40 % befinden sich im Kern. Die Lokalisation von RevGFP (74 %), Rev1-54GFP (68 %) und Rev1-54RispGFP (70 %) und der Effekt von Leptomycin B auf diese Proteine ist sehr ähnlich. Die Lokalisationen dieser Proteine sind in diesem Versuchssystem nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$ nach Mann-Whitney).

Die Medianwerte des Anteils der Kernfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz der quantifizierten Populationen von HeLa-Zellen sind zum direkten Vergleich in Tabelle 4.10.1 aufgelistet.

Protein	Mediane der Lokalisation		Mann-Whitney p-Werte
	ohne LMB	mit LMB	
GFP	47,12	48,75	0,6525 = ns
RevGFP	74,00	82,00	0,0012 = s
RispGFP	37,50	47,50	0,0001 = s
Rev1-54GFP	67,90	73,62	0,0001 = s
Rev1-54 RispGFP	70,00	82,00	0,0393 = s

Tabelle 4.10.1: Mediane der Quantifizierungen der Rev- und Risp-Fusionsproteine mit einem GFP-Anteil mit oder ohne Leptomycin B-Behandlung. Die dritte Spalte zeigt die statistische Signifikanz der Unterschiede (+/- LMB) als p-Wert des Mann-Whitney-Tests (s=signifikant $p < 0,05$ < p ns=nicht signifikant).

Das RispGFP-Fusionsprotein zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. Risp ließ sich durch eine spezifische Hemmung des Crm1-vermittelten Kernexports durch Leptomycin B zu einem vermehrten Vorhandensein im Nukleus und somit zu einer gleichmäßigen Verteilung in den Zellen verschieben. Der durch die Interaktionsstudien ermittelte Zusammenhang zwischen Risp und Crm1 wird dadurch auf einer funktionalen Ebene gezeigt.

4.10.2 Wiedererlangung der Kernexportfähigkeit von Rev1-54 durch Risp

Um den Einfluss der Risp-Aminosäuresequenz auf das Lokalisationsverhalten von Rev1-54 und somit die Transporteigenschaften von Risp detaillierter untersuchen zu können, wurden folgende Rev- und Risp4GFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen exprimiert:

- 4GFP
- Rev-4GFP
- Rev1-54 4GFP
- Rev1-54Risp 4GFP

Die vier hintereinander liegenden GFP-Sequenzen ermöglichten es, die Lokalisation der Proteine unter weitgehendem Ausschluss von Diffusionsvorgängen zu studieren. Die kompletten Fusionskonstrukte lagen mit einer Größe von 120 kDa deutlich oberhalb der theoretischen Diffusionsgrenze von Kernporen. J. Barthelmes konnte in seiner Diplomarbeit (2001) zeigen, dass Rev-4GFP entgegen dem in HeLa normalen Lokalisationsverhalten von RevGFP stark zytoplasmatisch akkumuliert. Das N-terminale Fragment Rev1-54, gekoppelt mit 4GFP, weist jedoch eine identische nukleäre Lokalisation auf, wie das selbe Fragment gekoppelt mit nur einem GFP.

Durch die Konstruktion von 4GFP-Fusionsproteinen mit Rev1-54Risp sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Kernexportfähigkeit des Risp-Anteils mit der Exportfähigkeit von Rev vergleichbar ist und ob dadurch ebenfalls eine zytoplasmatische Akkumulation bewirkt wird. Das Fusionskonstrukt repräsentiert die NLS-Sequenz von Rev (N-terminal) und die Exportfunktionalität von Risp. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und daraufhin quantifiziert.

In Abbildung 4.10.2 sind die Quantifikationen des Anteils der Fluoreszenz im Kern der Zellen als Graph gezeigt. Jeweils ein Bild (Phasenkontrast und Fluoreszenz) der Lokalisation der verschiedenen Fusionsproteine ist gezeigt.

Vier gekoppelte GFP lagen mit 41 % zu einem signifikant ($p < 0,0001$) geringeren Prozentsatz im Kern vor als einzelne GFP-Moleküle (47 %; Kap. 4.10.2). Rev4GFP zeigte eine Akkumulation im Zytoplasma (26 % im Kern), wohingegen sich Rev1-54-4GFP deutlich im Nukleus anhäufte (76 %). Es zeigte sich, dass der zusätzliche Risp-Anteil, gekoppelt an die N-terminalen 54 Aminosäuren von Rev, dazu führte, dass die starke Akkumulation von Rev1-54 4GFP im Kern um 25 % vermindert wird. Mit 51 % im Kern lokalisierten Molekülen lag das Rev1-54Risp-Fusionskonstrukt jedoch um 25 % mehr im Nukleus vor als Rev4GFP. Die beschriebenen Unterschiede innerhalb dieses Experimentes zeigten alle einen p-Wert unter 0,003 (Tab. 4.10.2) und waren somit als statistisch signifikant anzusehen.

Die Medianwerte des Anteils der Kernfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz der quantifizierten Populationen von HeLa-Zellen sind zum direkten Vergleich in Tabelle 4.10.2 aufgelistet.

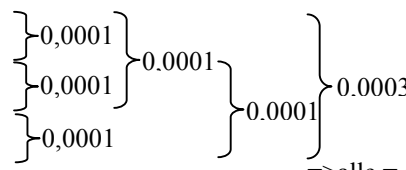
Protein:	Median der Fluoreszenz im Kern	Mann-Whitney p-Werte
4GFP	41,00	
Rev4GFP	26,00	
Rev1-54 4GFP	76,00	
Rev1-54 Risp 4GFP	51,00	

Tabelle 4.10.2: Mediane der Quantifizierungen der Rev- und Risp-Fusionsproteine mit vier GFP-Anteilen ohne Leptomycin B-Behandlung. Die zweite Spalte zeigt die statistische Signifikanz der Unterschiede der einzelnen Proteinlokalisationen als p-Wert des Mann-Whitney-Tests (alle Unterschiede sind s=signifikant $p < 0,05$).

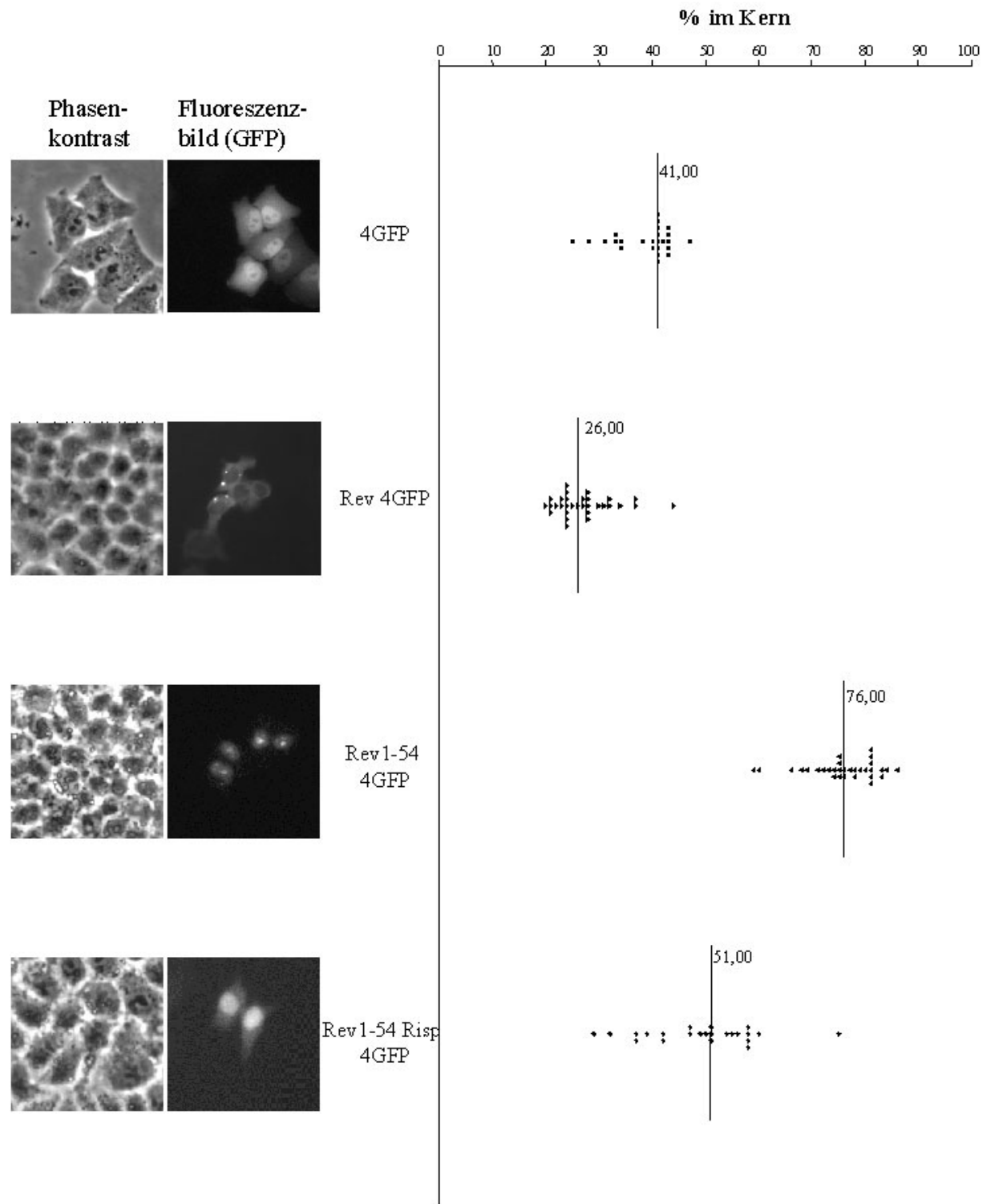


Abbildung 4.10.2: Zusätzliche Exporteigenschaft vermittelt durch einen Risp Proteinanteil. Lokalisationsverhalten von 4GFP, Rev4GFP, Risp4GFP, Rev1-54 4GFP und Rev1-54Risp4GFP in HeLa-Zellen. Zusätzlich sind jeweils parallel zu den ausgewerteten Zellpopulationen beispielhafte Bilder der quantifizierten Zellen im Phasenkontrast und Fluoreszenzbild der vier GFP-Anteile gezeigt.

Die fusionierte Risp-Proteinsequenz führte zu einer partiellen Wiedererlangung der Kernexportfähigkeit des N-terminal deletierten Rev1-54. Die spezielle Lokalisation des vollständigen Rev mit vier GFP-Resten wurde durch die an Rev1-54 hinzugefügte Risp-Sequenz mit ihren Export- und Dimerisierungseigenschaften nicht wiederholt. Diese Lokalisation benötigt also weitere Rev spezifische Merkmale.

4.10.3 Analyse der Rev-Funktion der Fusionsproteine

Zur Analyse der Funktionsfähigkeit der Proteine, welche für die Lokalisationstests verwendet wurden, wurde das System der Rev- und Tat-abhängigen Expression des modifizierten *DsRed*-Reportergens (pLRed(2xINS)R) herangezogen. Hierfür wurden HeLaTat-Zellen transfiziert, nach 48 h geerntet und in einer grün-fluoreszierenden Lebendzellpopulation alle ebenfalls rot-fluoreszierenden Zellen ermittelt.

Tabelle 4.10.3 zeigt detailliert die durch die FACS-Analyse ermittelten Anteile (prozentual und real) der einzelnen Zellpopulationen.

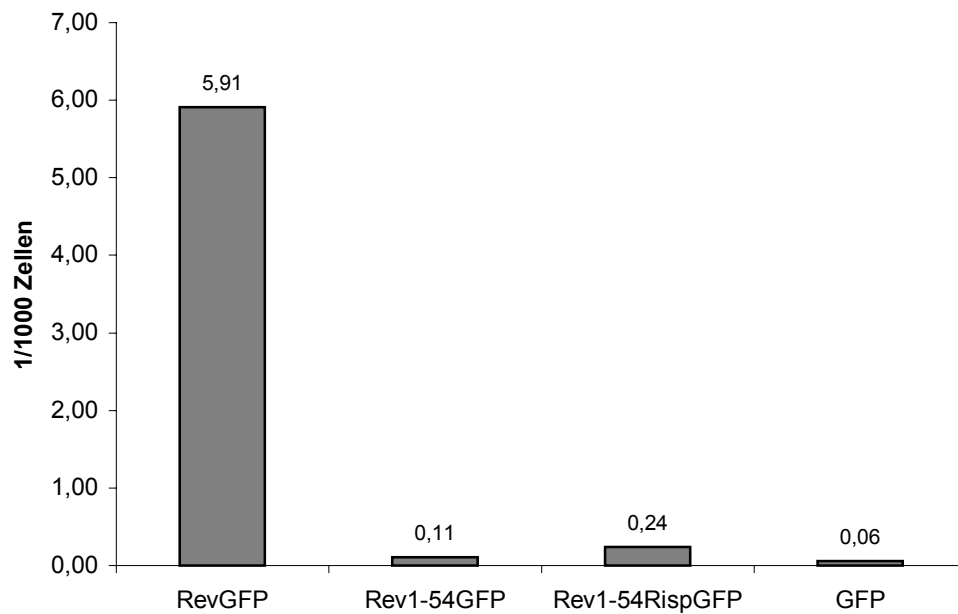
Fusionsproteine		Rote Fluoreszenz		Grüne Fluoreszenz		Rot-Grün ‰
		%	Zellzahl	%	Zellzahl	
A	RevGFP	0,15	215	23,92	36369	5,91
	Rev1-54GFP	0,00	3	18,09	27269	0,11
	Rev1-54Risp GFP	0,00	4	11,03	16735	0,24
	GFP	0,00	2	23,30	24299	0,06
B	Rev 4GFP	0,21	226	36,47	40171	5,63
	Rev1-54 4GFP	0,00	3	24,39	25509	0,10
	Rev1-54Risp 4GFP	0,00	3	3,15	3570	0,84
	4GFP	0,01	6	33,23	34639	0,16

Tabelle 4.10.3: Gemessene Zellpopulationen der Funktionsanalyse der Fusionsproteine Rev 4GFP, Rev1-54, Rev1-54Risp fusioniert mit einem (A) oder vier GFP-Resten (B). Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil und die Zahl der rotfluoreszierenden Zellen und der grünfluoreszierenden Zellen in der Lebendzellpopulation und den promille Anteil rot-grün doppelt positiver Zellen in den grün fluoreszierenden Zellen.

Die doppelt-positiven (rot-grünen) Zellen in der grünfluoreszierenden Population zeigen die Expression des Reporterproteins und somit funktionelles Rev an. Es zeigten sich jeweils eine deutliche Population an grünfluoreszierenden, also GFP, oder ein GFP-Fusionsprotein exprimierende Zellen. Die geringste Expression zeigte hierbei das Fusionsprotein Rev1-54Risp mit 4GFP. Nur etwa 3 % der Zellen fluoreszierten grün, wohingegen das Rev1-54Risp-Konstrukt mit einem GFP in ca.11 % der Zellen exprimiert wurde. Die Expression der weiteren Konstrukte lag zwischen 23 % bei GFP und 36 % bei RevGFP. Ein graphischer Vergleich der Zellen, welche durch ein

funktionelles Rev zur Expression von *DsRed* in der Lage waren, ist in Abbildung 4.10.5 dargestellt. Die positiven Zellpopulationen in den verschiedenen Ansätzen mit einem GFP (A) oder 4GFP (B) sind dargestellt.

A.



B.

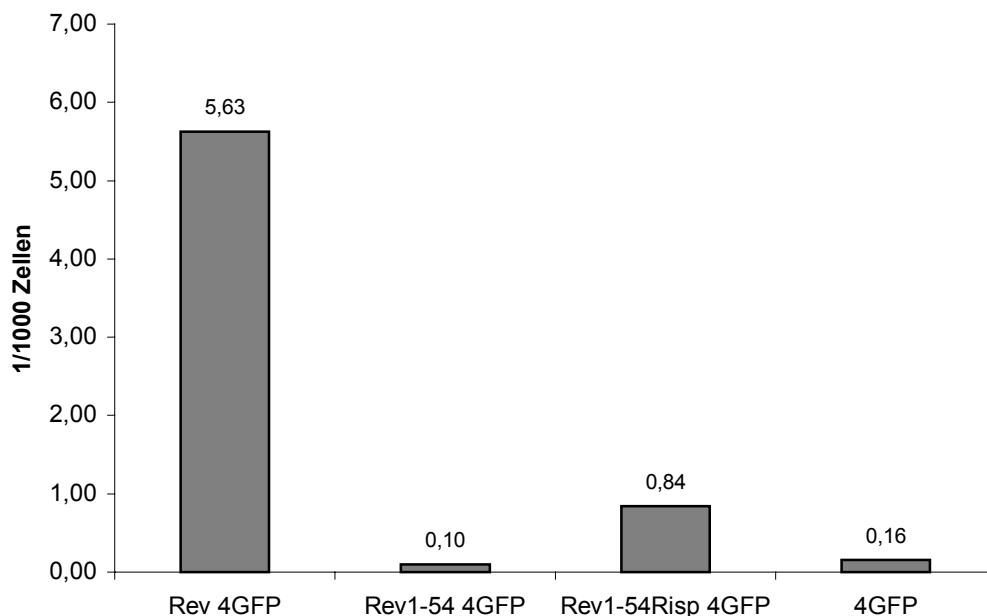


Abbildung 4.10.3: Die C-terminale Hälfte von Rev kann funktional nicht durch Risp ersetzt werden. Die Balken geben die Funktionalität des Rev-Anteils in den Fusionsproteinen Rev, Rev1-54, Rev1-54Risp mit einem (A) oder vier GFP-Resten (B) anhand der unterschiedlichen Fähigkeit zur Aktivierung der Expression des Rev-abhängigen *DsRed* wieder. Gemessen wurde die Anzahl der durch grüne und rote Fluoreszenz als doppelt positiv detektierten Zellen (HeLaTat) pro 1000 Zellen. Als funktionslose Negativkontrolle agierte GFP oder 4xGFP ohne Rev-Effektoranteil.

Nur die beiden vollständigen Rev-Proteine unabhängig des GFP-Anteils führten zu einer Expression von *DsRed* in 5,6 und 5,9 Promille der Zellen. In den Ansätzen mit dem gekürzten Rev1-54-Proteinanteil (0,11 ‰ und 0,10 ‰) oder ohne Rev (0,16 ‰ und 0,06 ‰) wird demnach in 35-50fach weniger Zellen das rote Protein exprimiert. Das Fusionskonstrukt von Rev1-54 und Risp mit einem GFP führt zu einer Expression in 0,24 ‰ mit vier GFP in 0,84 ‰ der Zellen. Die Zahlenwerte der durch die FACS-Analyse ermittelten positiven Zellen lagen im Promillebereich. Den 0,84 ‰ bzw. 0,24 ‰ der Rev1-54Risp-Fusionsproteine lagen nur 3 bzw. 4 Einzelzellen zu Grunde, wodurch diese Werte als nicht relevant angesehen werden können.

Risp verändert die intrazelluläre Lokalisationseigenschaft von Rev1-54, führt aber nicht zur Rekonstitution eines funktionalen Rev-Proteins.

4.10.4 Untersuchungen der Export- und Importfähigkeiten der Rev-NES und eines leucinreichen Risp-Peptids

Ein möglicher Bereich, der für die Kernexporteigenschaften des Risp-Proteins verantwortlich ist, konnte eingegrenzt werden (Ceccherini-Silberstein, 2001). Aus diesem Bereich wurde eine Peptidsequenz aus 21 AS mit Ähnlichkeiten zu bekannten NES Sequenzen ausgewählt und synthetisch hergestellt. Zusätzlich wurde ein Peptid (15 AS) hergestellt, welches die definierte Sequenz des Kernexportsignals von Rev (AS 73-84) repräsentierte. Die Peptidsequenzen sind in Abbildung 4.10.4 gezeigt. Diese Peptide wurden an BSA gekoppelt, welches wiederum mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Die markierten Peptid-BSA-Komplexe wurden zusammen mit rot-fluoreszierend-markiertem BSA in HeLa-Zellen koinjiziert. Zur Untersuchung des Kernexportverhaltens wurden Zellen nukleär injiziert, zur Untersuchung des Importverhaltens wurden Zellen zytoplasmatisch injiziert und unter LMB-Behandlung inkubiert. Zur Bewertung der Lokalisation der Peptide wurde der Transportquotient berechnet (Kap. 3.1.10.2). Tabelle 4.10.4A zeigt das Ergebnis der Quantifikationen der Risp-Peptidlokalisation im Vergleich zu BSA. Die markierte BSA-Kontrolle blieb nach einer Kerninjektion mit 39 % der Gesamtfluoreszenz in diesem Bereich. Die Translokation, welche dazu führte, dass nicht 100 % im Kern blieben, ließ sich auf Ausfluss aus dem Kern während der Injektion und normale Diffusion von BSA zurückführen. Das nukleär injizierte Risp-Peptid lag zu einem geringeren Prozentsatz (31 %) im Kern vor. Nach zytoplasmatischer Injektion und LMB-Behandlung der HeLa-Zellen lag BSA zu 27 % im Kern vor, das Risp-Peptid allerdings lag unter den gleichen Bedingungen zu 45 % im Kern vor. Tabelle 4.10.4B zeigt das Ergebnis der Experimente mit der NES-Sequenz von Rev. Das Rev-NES-Peptid lag 10 % weniger im Kern vor als das koinjizierte BSA (25 % zu 35 %). Zytoplasmatisch injiziertes BSA unter LMB-Einwirkung zeigte sich zu 42 % auch im

Kern, jedoch wurde das Rev-NES-Peptid unter den gleichen Bedingungen stärker in den Kern importiert (55 %). Die Mediane der quantifizierten Zellen und die statistischen p-Werte (Mann-Whitney) der Vergleiche von BSA zu den Peptidkonjugaten sind aufgelistet (Tab 4.10.4).

A	Risp-Peptid	Export: nukleäre Injektionen		Import: zytoplasmatis. Injektionen	
	Injektion	BSA	Risp NES	BSA +LMB	Risp NES +LMB
	Median % in Kern	39	31	27	45
	p-Wert	0,0008		0,0005	
	Transportquotient	0,795		1,667	
B	Rev-Peptid:	Export: nukleäre Injektionen		Import: zytoplasmatis. Injektionen	
	Injektion	BSA	Rev NES	BSA +LMB	Rev NES +LMB
	Median % in Kern	35	25	42	55
	p-Wert	0,0001		0,0111	
	Transportquotient	0,714		1,310	

Tabelle 4.10.4: Detaillierte Liste der Daten der Quantifizierungen der Lokalisationen der Peptide und der BSA-Kontrollen. Zudem wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Peptiddaten und der Kontrolldaten des BSA errechnet. Der Transportquotient errechnet sich aus dem Medianwert der Lokalisation des Testpeptides durch den Median der BSA-Kontrolle.

Eine graphische Darstellung der errechneten Transportquotienten und für den Transporteffekt beispielhafte Bilder der rot-markierten Peptide und des grün-markierten BSA in HeLa-Zellen ist in Abbildung 4.10.6 gezeigt. Wurde das Risp-Peptid zytoplasmatisch injiziert, wurde es importiert, nukleär injiziert, wurde es exportiert (Abb. 4.10.6 rechts). Im gleichen Maße wurde zytoplasmatisch injiziertes Rev-NES-Peptid importiert, nukleär injiziertes exportiert (Abb. 4.10.6 links).

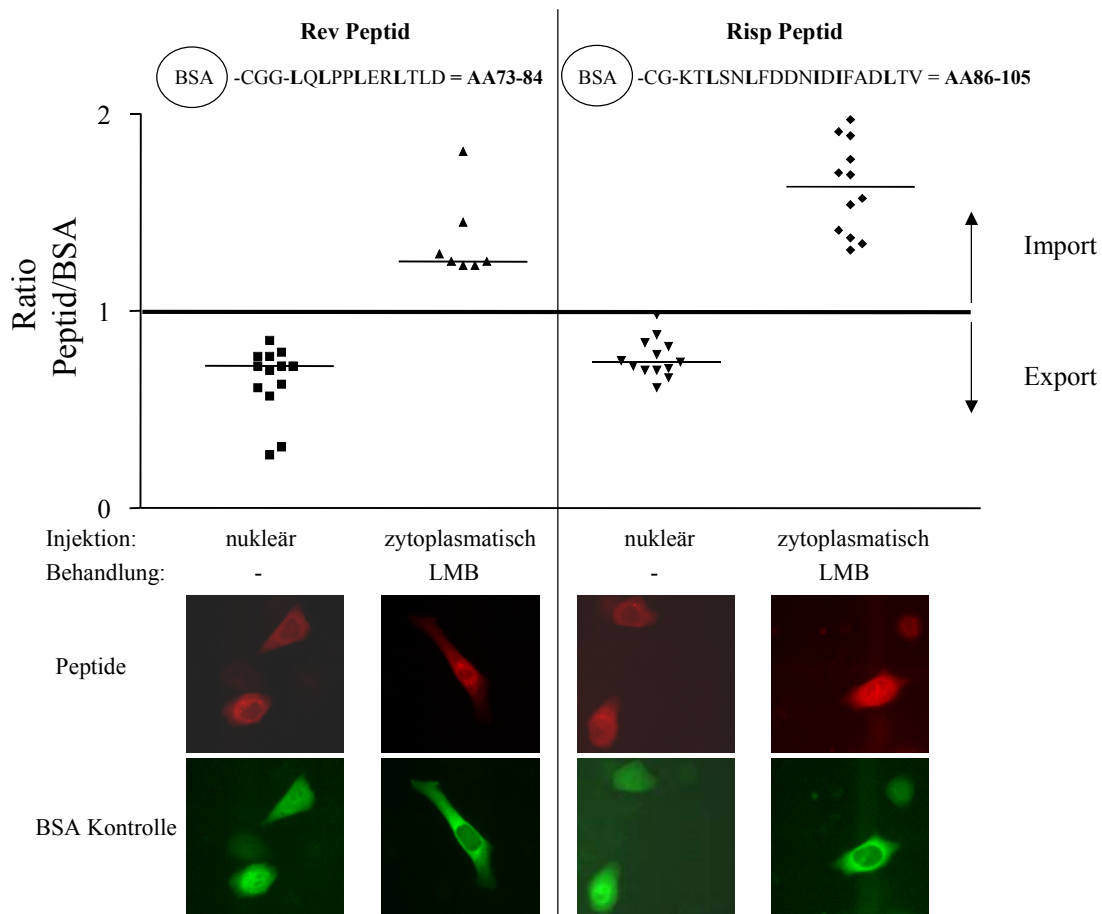


Abbildung 4.10.4: Die Rev-NES (links) sowie eine leucinreiche Peptidsequenz von Risp (rechts) zeigen beide die Fähigkeiten zum Kernimport sowie -export. Dargestellt sind die errechneten Transportbewegungen der Peptide und die Lokalisationen 2 h nach Mikroinjektion von rot-fluoreszenzmarkierten, an BSA-gekoppelten Risp- oder Rev-Peptiden und grün-fluoreszenzmarkiertem BSA. Eine Untersuchung des Exportverhaltens wurde durch nukleäre Injektionen und des Importverhaltens durch zytoplasmatische Injektionen unter Einfluss von Leptomycin B durchgeführt.

Eine Peptidsequenz von 21 Aminosäuren der N-terminalen Hälfte von Risp, demnach des äußerst N-terminalen Endes von KIAA0592, besitzt die Fähigkeit, einen Transport in den Kern auszulösen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Fähigkeit von Risp, vermehrt im Nukleus zu erscheinen, nachdem der Kernexport gehemmt ist. Zusätzlich kann dieses Peptid auch einen Export aus dem Kern auslösen. Dies sind die Fähigkeiten eines sogenannten „Shuttle“-Proteins. Rev besitzt getrennte NLS und NES Sequenzen, aber die hier untersuchte NES-Peptidsequenz ist wie die Risp-Sequenz in der Lage ebenso den Kernimport auszulösen. Möglicherweise besitzt Rev somit die Fähigkeit, einen alternativen Weg des Kernimportes zu nutzen.

5 Diskussion

Das humane Immundefizienzvirus stellt weiterhin eine enorme epidemiologische Gefahr auf der Welt dar. Durch hochwirksame, aber finanziell aufwendige Therapien ist die Lebenserwartung HIV-Infizierter in den Industrienationen in Europa und Nordamerika extrem verbessert worden. Nichtsdestotrotz stellt eine HIV-Infektion weiterhin eine unheilbare Erkrankung dar, vor der es noch keinerlei Impfschutz gibt und die fatale Auswirkungen auf das menschliche Immunsystem hat. Die Identifikation von zellulären Funktionsmechanismen viraler Proteine und die damit einhergehende Suche nach virusinhibierenden Faktoren, die in der Therapie eingesetzt werden können, hat demnach keineswegs an Bedeutung verloren.

Nach der Identifizierung des neuen Rev-interagierenden Proteins Risp (171 AS) stellte sich die Frage, welche zellulären Funktionen dieses Protein ausführt und welchen Einfluss es auf HIV-1 Rev ausüben bzw. welcher Funktion es im Zusammenhang mit Rev im HIV-Lebenszyklus dienen könnte.

5.1 Rev-interagierende Faktoren als Ansatzpunkte für anti-HIV-Therapeutika

Die Möglichkeiten anti-HIV Therapien zu entwickeln, wurden von R. Morgan (Morgan, 1999) zusammengefasst und sind in Abbildung 5.1.1 vereinfacht dargestellt. Spezielle Charakteristika von Rev, die als Ansatzpunkte einer HIV-Inhibition dienen könnten, wurden schon 1997 von A. Heguy erörtert (Heguy, 1997).

Neuere Arbeiten fokussieren weitestgehend auf die charakteristische RNA-Bindung von Rev und die Möglichkeiten, diese zu inhibieren (Bai et al., 2002; Chapman et al., 2002; Coburn and Cullen, 2002; Ding et al., 2002; Fineberg et al., 2003; Lee et al., 2002; Mautino, 2002; Mautino and Morgan, 2002a; Mautino and Morgan, 2002b; Mautino and Morgan, 2002c), aber auch auf den spezifischen Crm1-vermittelten Kernexport von Rev (Daelemans et al., 2002) und die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen (Amendola et al., 2001; Bevec et al., 1996; Li et al., 2002a; Li-En Jao and Yu Chen, 2002).

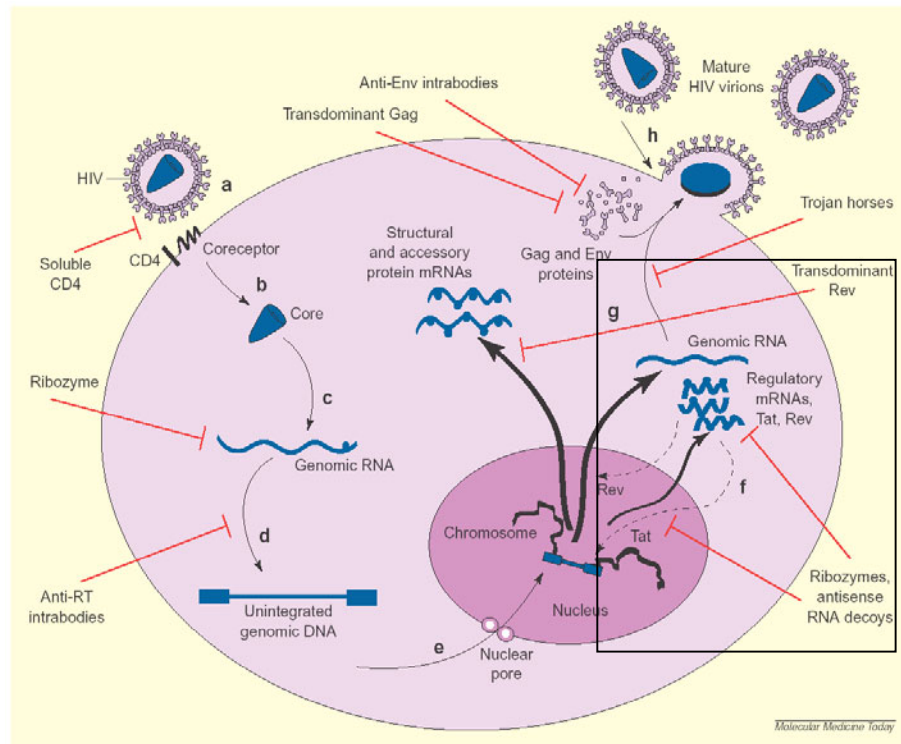


Abbildung 5.1.1: Vereinfachtes Modell des Lebenszyklus von HIV und der potenziellen therapeutischen Ziele. Die Bindung a) von HIV an CD4 und einen Korezeptor. Lösliches CD4 könnte dies blockieren. Nach b) der Internalisierung und c) der Enthüllung des viralen ssRNA-Genoms wird dieses d) durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben. Diese Schritte könnten durch Ribozyme blockiert werden, welche die ssRNA abbauen oder durch Antikörper gegen die RT. Die genomische DNA wird e) in den Zellkern importiert und dort in das Wirtszellgenom integriert. Die Transkription, die Translation und der Kernexport der mRNA durch zelluläre Mechanismen werden durch f) Rev und Tat reguliert. Rev und Tat sind somit die Hauptziele der anti-HIV Gentherapie. Sie könnten durch Ribozyme, antisense RNA-Köder und transdominantes Rev oder Tat ausgeschaltet werden. Der Zusammenbau der Virione selbst f) könnte durch Antikörper oder transdominante Proteine verhindert werden. Letztlich könnten bei der Knospung des reifen Viruspartikels anti-HIV Faktoren als „Trojanische Pferde“ mit verpackt werden. Die zentrale Rolle der Funktion von Rev und Tat bei der Entwicklung von antiviralen Therapien ist hervorgehoben (Rahmen) (Morgan, 1999).

Die selektive Hemmung wichtiger Interaktionen mit zellulären Proteinen wurde aber erst später betrachtet.

Die bisher in der Literatur beschriebenen zellulären Partner von Rev (Kap. 1.4) sind hauptsächlich und direkt mit dem Kernimport (z.B. Importin β) oder dem Kernexport (z.B. Crm1) verbunden. Für weitere zelluläre Proteine ließ sich eine direkte Interaktion mit oder ein Einfluss auf HIV-1 Rev nachweisen (z.B. B23, p32, eIF5A und CK2). Oft ist die eigentliche zelluläre Funktion der Rev-interagierenden Proteine weitgehend unbekannt (z.B. B23 und eIF5A), oder die ursprünglich für manche Proteine beschriebenen Funktionen sind nach Beschreibung ihrer Beteiligung am Kernexport

oder -import in den Hintergrund gerückt. Zum Beispiel wurde Crm1/Exportin als Protein zur Aufrechterhaltung von Chromosomenregionen (Crm1 = „chromosome region maintenance“) beschrieben (Adachi and Yanagida, 1989), ist heute jedoch anerkannt als einer der Hauptfaktoren des Kernexportes ohne weiteren Zusammenhang mit den Chromosomendomänen. Das Protein eIF5A wurde im Zusammenhang mit der Initiation der Proteinsynthese als eIF4D beschrieben (Smit-McBride et al., 1989). Interessant war dabei, dass dieser Faktor die seltene Aminosäuremodifikation Lysin₅₀ zu Hyposin trägt, was essentiell für die Proteinfunktion ist. Heute ist bekannt, dass eIF5A die ribosomale Peptidyltransferase während der Translation stimuliert, aber auch eine wichtige Funktion im nukleozytoplasmatischen Transport eukaryotischer mRNA spielt (Jenkins, Haag, and Johansson, 2001). Obwohl eIF5A essentiell für das Überleben und die Vermehrung von Zellen ist, ist über die genaue Funktion und die molekulare Genetik von eIF5A weiterhin noch sehr wenig bekannt. Das Gen von eIF5A war das erste eines eukaryotischen Rev-Kofaktors, das auf das menschliche Genom (17p12-p13) kartiert werden konnte (Steinkasserer et al., 1995). Eine Zeit lang galt eIF5A als vielversprechender Ansatzpunkt zur Entwicklung einer HIV-1 Therapie auf der Basis der Rev-Inhibition. Es wurden Mutanten hergestellt, welche die Rev-Transaktivierung und den Rev-vermittelten Kernexport blockieren konnten, aber die Zellfunktion nicht beeinflussten (Bevec et al., 1996). Verschiedene kommerzielle Firmen (z.B. Axxima, München, Sandoz und Novartis, Wien) führten Untersuchungen durch, um anhand des Einflusses von eIF5A auf Rev ein anti-HIV Therapeutikum zu entwickeln. Zum Beispiel wurde von der Firma Axxima, München ein Hemmstoff der eIF5a:Rev-Interaktion (AXD455) bis zur klinischen Phase II getestet, dann aber verworfen. Es existiert also bisher kein therapeutisch nutzbarer Hemmstoff, der Rev inhibiert.

Eine Liste der derzeit in den USA durchgeführten klinischen Studien zu dem Thema der HIV-Therapie kann auf der Internetseite <http://www.clinicaltrials.gov> des National Institute of Health (NIH, NLM, Bethesda, USA) und der Food and Drug Administration (FDA, Rockville, USA) eingesehen werden. Ein Ansatz, der auf der spezifischen Hemmung von Rev basiert, existiert dabei nicht.

5.2 Identifikation der vollständigen Proteinsequenz von KIAA0592: Eigenschaften, Funktionalität und Verwandtschaften

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtsequenz des KIAA0592-Proteins ermittelt und die Eigenschaften dieser Sequenz erörtert. Die Frage der Funktion von Risp nach der Entdeckung, dass Risp den C-terminalen Proteinanteil eines etwa acht mal so großen zellulären Proteins (KIAA0592) darstellt, bekam in diesem

Zusammenhang eine völlig andere Dimension. Es handelte sich nicht mehr um ein kleines, zum nukleozytoplasmatischen Pendeln fähiges Protein, sondern um ein großes, hauptsächlich zytoplasmatisches Protein mit auf Grund der Größe komplexeren Eigenschaften. Diese Entdeckung musste zudem zu einer Reevaluierung der Ergebnisse über die Rev-Bindungsfähigkeit und deren Auswirkungen auf Rev führen, da ein 1372 AS großes Protein nicht nur unterschiedliche Eigenschaften, sondern auch einen unterschiedlichen Einfluss haben musste.

Die publizierte cDNA von KIAA0592 mit der Accession-Nummer AB011164 wird durch die Autoren selbst (Nagase et al., 1998a) als unvollständig am 5' Ende beschrieben. Die in den Datenbanken (NCBI) als KIAA0592-Protein mit der Nummer BAA25518 beschriebene Aminosäuresequenz stellt eine direkte *in silico* Translation der publizierten cDNA dar und beginnt mit dem ersten Basentriplett dieser DNA-Sequenz. Dabei wird die Basenabfolge [gtc acg ccc cgc gca--] in den Proteinbeginn mit den Aminosäuren [VTPRA--] übersetzt. Auffällig ist, dass weder eine 5' untranslatierte Region in der cDNA vorhanden ist, noch die Proteinsequenz mit einem Methionin kodiert durch ein ATG-Codon beginnt. Ein Methionin am Beginn der translatierten Sequenz ist aber nötig, da dadurch das Startsignal zur Translation durch die ribosomale Maschinerie vermittelt wird. 32 Aminosäuren innerhalb der publizierten Proteinsequenz befindet sich ein möglicher Translationsstart. Hierbei handelt es sich bei den ersten fünf Aminosäuren um die Sequenz [MMNRT--]. Ein Vergleich der zur Stabilisierung der Proteinsequenz beschriebenen ersten Aminosäuren nach der N-terminalen Endregel (Varshavsky, 1996) zeigte, dass die ermittelte neue Anfangssequenz des KIAA0592komplett-Proteins [MAGRIT--] demnach eine höhere Proteinstabilität nach sich ziehen müsste. Hierbei wirken das Alanin und Glycin zusätzlich zu dem ersten Methionin stabilisierend. Untersuchungen der Sequenz der KIAA0592-mRNA im Hinblick auf die Umgebung der möglichen Translationsinitiationsstellen (ATG), die jeweils für ein Methionin kodieren, wurden durch einen Vergleich mit der publizierten Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1984) durchgeführt. Diese Konsensussequenz wird heutzutage nicht mehr als verbindlich angesehen (Peri and Pandey, 2001), aber in vielen Transkripten dient diese Sequenz eindeutig der Erkennung des vorteilhaftesten Translationsstarts einer mRNA-Sequenz. Das durch die Extrapolation des Leserahmens von KIAA0592 ermittelte erste ATG wird von einer fast idealen Kozak-Sequenz umgeben. Es stimmen hier sieben von neun Basen überein. Dies ist eine eindeutig vorteilhaftere Sequenzumgebung als bei den nächsten beiden direkt aufeinanderfolgenden ATG-Codons inmitten (nach weiteren 32 Triplets) des KIAA0592-Leserahmens. Ich nehme daher an, dass das von mir ermittelte ATG-Codon auch der Translationsstart des endogenen reellen Proteins ist.

Obwohl die exakte Größe des tatsächlichen mRNA-Transkriptes von KIAA0592 nur experimentell ermittelt werden kann, deuten die hier gezeigten Daten der Sequenzanalyse darauf hin, dass das translatierte KIAA0592-Protein beginnend mit der Sequenz [MAGRIT] abgelesen wird und 1372 Aminosäuren umfasst. So muss der eigentliche mRNA-Beginn noch vor diesem Translationsstart liegen. Diese vollständige mRNA wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben und konnte auch z.B. durch SMART RACE-Verfahren von Clontech, BD Biosciences (Borson, Salo, and Drewes, 1992; Chenchik, 1998) nicht amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die zweite lange Proteinsequenz T00347, die anhand der KIAA0592-cDNA annotiert wurde, stellt das humane Proteinfragment DKFZp566G1246 dar. Diese Sequenz wird als Revision zu KIAA0592 mit punktuellen Veränderungen beschrieben, ist aber zu 100 % identisch mit der vorher publizierten KIAA0592-Sequenz. Es stellt sich die Frage, warum Proteine in dieser Art doppelt annotiert werden. Weitere Sequenzen, die auf Aminosäureebene als ähnlich zu KIAA0592 identifiziert wurden, weisen entweder direkt auf KIAA0592 hin oder entsprechen KIAA0592 zu einem erheblichen Teil, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei um unvollständige Transkripte eines gemeinsamen menschlichen Genes handeln sollte.

Dadurch, dass keine weiteren zu KIAA0592 homologen menschlichen Gene, Proteine bzw. Proteinfragmente mit einer zugewiesenen Funktion identifiziert werden konnten, war es nicht möglich, gezielte Untersuchungen auf mögliche Funktionen des neuen Proteins durchzuführen. Deswegen wurde in dieser Arbeit die Proteinsequenz von KIAA0592 *ab initio* auf ihre strukturellen Eigenschaften und Sequenzbesonderheiten untersucht. Die 1372 AS des KIAA0592komplett-Proteins zeigen über die gesamte Sequenz hinweg deutliche Bereiche, denen eine Sekundärstruktur zugeordnet werden kann. Hierzu gehören vor allem am N-terminalen Ende ausgedehnt zusammenhängende helikale Bereiche. In diesem Bereich (AS 150-300) und in dem Mittelbereich (AS 650-850) wurde auch mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bildung sogenannter „Coiled Coil“-Strukturen vorausgesagt (Kap. 4.1.3). Diese Strukturen bestehen aus einer Anhäufung von α -Helices, die sich untereinander wiederum zu einer Superhelix verdrehen. Zuerst identifiziert wurden diese Strukturen schon 1953 von L. Pauling und R.B. Corey sowie von F.H.C. Crick als struktureller Hauptbestandteil von fibrösen Proteinen wie Keratin, Myosin und Fibrinogen (Crick, 1953; Paulin, 1953). Später wurden dann „Coiled Coil“-Strukturen im Hämagglutinin des Influenzavirus (Wilson, 1981), dem Katabolit-Genaktivator (CAP) (MacKay, 1981) und verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Landschutz, 1988), die „Leucin zipper“-Strukturen ausbilden, identifiziert. „Coiled Coil“-Strukturen spielen eine große Rolle bei Protein:Protein oder Protein:Nukleinsäure-Interaktionen. Diese vorausgesagten „Coiled Coil“-Strukturen scheinen aber nicht im Zusammenhang mit

der beobachteten Risp:Risp-Proteinbindung (Kap. 4.8) zu stehen, da für Risp keine dieser Strukturen vorausgesagt werden konnte. Im Zusammenhang mit der betonten zytoplasmatischen Lokalisation des KIAA0592-Proteins könnte diese superhelikale Sekundärstruktur zur Ausbildung einer strukturellen Komponente des Zytoplasmas beitragen (Perry, 2001; Strelkov, Herrmann, and Aebi, 2003). Möglicherweise kann KIAA0592 dadurch auch mit verschiedenen fibrösen Filamenten oder mit aus dem Kern exportierten Proteinen im Zusammenhang mit Crm1 interagieren. Ebenfalls wurde gezeigt, dass nukleäres Actin als struktureller Bestandteil im Zusammenhang mit dem Kernexport von HIV-1 Rev steht (Hofmann et al., 2001).

Für die Proteinsequenz von KIAA0592 konnte eine Transmembrandomäne vorausgesagt werden, die durch die Aminosäuren 24/25-40/41 am N-Terminus repräsentiert wird. Das KIAA0592-Protein enthält diese Domäne nur, wenn die komplette in dieser Arbeit ermittelte Sequenz abgelesen wird. Diese Transmembrandomäne liegt vor dem zweiten möglichen Translationsstart, der in der publizierten Proteinsequenz der Datenbanken vorhanden ist. Da ich diesen Translationsstart aber weitestgehend anhand der Sequenzanalyse ausschließen konnte, muss davon ausgegangen werden, dass KIAA0592 die Fähigkeit besitzt, sich in zelluläre Membranen einzulagern. Weitere Signalpeptide, die zur Lokalisation in bestimmten Zellkompartimenten, wie z.B. Mitochondrien, nötig sind, konnten nicht ermittelt werden.

Posttranslationale Modifikationen führen oft erst zu einer Aktivierung eines Proteins. Ohne diese Modifikationen könnte es seine zelluläre Aufgabe nicht ausführen. Für KIAA0592 wurden insgesamt 78 kurze Signalsequenzen für unterschiedliche Modifikationen gefunden. Diese Signale kommen statistisch gesehen häufig vor und so müssen die einzelnen Signale erst experimentell verifiziert werden. Andere Proteine vergleichbarer Größe zeigen eine unterschiedliche Zahl dieser Modifikationsstellen. Crm1 mit 1071 AS enthält nur 32 Signalsequenzen, das unbekannte Protein KIAA0590 mit 1138 AS ebenfalls 70 und das Strukturprotein Nestin mit 1618 AS sogar 114 (Sequenzanalyse der Proteine anhand der PROSITE-Datenbank (Falquet et al., 2002)). Die Zusammensetzung der Modifikationssignale unterscheidet sich nur unwesentlich. Am häufigsten sind Phosphorylierungssignale der Caseinkinasen und Proteinkinase C. KIAA0592 unterscheidet sich von den anderen erwähnten Proteinen dadurch, dass es als einziges über ein potenzielles Sulfationssignal und über einen glutamatreichen Sequenzabschnitt verfügt. Die Funktion der Tyrosin-Sulfation wurde bisher nur in wenigen Fällen eindeutig nachgewiesen. Diese Modifikation wird im Golgi-Apparat durchgeführt und wurde bisher bei sekretierten Proteinen, Neuropeptiden und am intrazellulären Proteintransport beteiligten Proteinen

identifiziert (Beinfeld, 2003; Huttner, 1988; Niehrs, Beisswanger, and Huttner, 1994; White et al., 1998).

Eine Vielzahl der zellulären regulatorischen Mechanismen, wie z.B. die Vermittlung von Rezeptorsignalen (Pawson, 2002), (Wong and Fish, 2003), die Zellzykluskontrolle (Pelech and Charest, 1995) und die Transkriptionskontrolle (Macian, Lopez-Rodriguez, and Rao, 2001) beruht auf der zum Teil kaskadenartigen Phosphorylierung von im Signalweg hintereinander liegenden Proteinen. Dabei werden oft Proteine phosphoryliert, die selbst Kinaseeigenschaften besitzen. Der Effekt des Hinzufügens von Phosphatresten lässt sich alleine durch die Sequenzanalyse nicht bestimmen. Hierzu müssten die Modifikationsstellen nach der Verifikation möglicherweise selektiv mutagenisiert werden, um einen Effekt zu erreichen. Hierbei besteht die Schwierigkeit darin vorherzusagen, welcher Effekt zu erwarten ist. Dies ist nur möglich, wenn zuerst weitere substantielle Hinweise auf die Funktion von KIAA0592 ermittelt werden können.

Myristoylierungen von Proteinen bedeutet die kovalente Verknüpfung eines Myristat-Restes (= gesättigte Fettsäure mit 14 Kohlenstoffatomen) an ein Glycin im N-terminalen Bereich eines Proteins nach der Entfernung des Start-Methionins. KIAA0592 verfügt an dritter Stelle der Aminosäuresequenz über ein Glycin. Typischerweise wirkt eine Myristoylierung im Zusammenspiel mit anderen Proteinmodifikationen auf Protein:Protein-Interaktionen und Funktionen (Farazi, Waksman, and Gordon, 2001). Außerdem wird durch eine Myristoylierung mancher Proteine (z.B. Src, MARCKS) zusammen mit elektrostatischen Anziehungen eine Membranbindung hervorgerufen (McLaughlin and Aderem, 1995; Resh, 1999). Zusammen mit der Transmembrandomäne könnte die Myristoylierung von KIAA0592 wiederum auf eine membranassoziierte Form vom KIAA0592 hinweisen.

Die erkennbare Aggregatbildung des endogen exprimierten KIAA0592komplett-Proteins könnte hiernach zum einen durch Protein:Protein-Interaktionen auf Grund der „Coiled Coil“-Strukturen erklärt werden oder auf eine Verankerung durch die Myristoylierung in intrazelluläre Membransysteme zurückzuführen sein.

Die reine Voraussage möglicher Modifikationen lässt keine endgültige Zuweisung einer Funktion des Proteins zu. Allerdings können einige Funktionsbereiche dadurch mit dem KIAA0592komplett-Protein in Verbindung gebracht werden. Vor allem die Membranständigkeit (durch Membranseparation und Proteindetektion) und der mögliche intrazelluläre Transport in Verbindung mit dem Zytoskelett (durch Kolo-kalisation und Koimmunopräzipitation) sollte weiter untersucht werden, da ich hier den Schlüssel für die zelluläre Funktion vermute.

Für KIAA0592komplett konnten orthologe Proteine in der Maus (*M. musculus*) und dem chinesischen Streifenhamster (*C. griseus*) nachgewiesen werden. Über die

gesamte Länge hinweg konnten Domänen identifiziert werden, welche in allen drei Spezies konserviert sind. Dabei sind vor allem die C-terminalen Hälften der drei Proteine durchzogen von langen, hoch konservierten Sequenzabschnitten. Diese Konservierungen lassen darauf schließen, dass dies für die Funktion wichtige Bereiche sind. In der Ratte (*R. norvegicus*) konnte ein kürzeres Protein (413 AS) als ortholog zu dem N-Terminus von KIAA0592komplett ermittelt werden. Dieses Protein der Ratte wurde durch eine automatisierte Analyse des vorhandenen Rattengenoms ermittelt. Da die Genomsequenz der Ratte in der Phase des Zusammensetzens ist, müssten diese Annotationen weiterhin nachgeprüft werden. Nach dem momentanen Stand der Sequenzen liegt in der Ratte nur dieses kürzere Transkript/Protein vor. Ausgehend von der Konservierung der Proteine innerhalb der Maus, des Hamsters und der Ratte wäre es aber zu erwarten, dass auch in der Ratte ein Protein der gleichen Länge und wahrscheinlich der gleichen Funktion existiert.

Die Proteinsequenzen der zu KIAA0592 homologen Proteine in der Maus, dem Hamster und der Ratte beginnen mit [MNRT--]. Dies würde dem zweiten möglichen Translationsstart des KIAA0592-Protein entsprechen. Die publizierten mRNA-Sequenzen dieser Spezies enthalten unterschiedlich lange 5' untranslatierte Bereiche. Allerdings wurde keines dieser Proteine direkt nachgewiesen sondern durch *in silico* Sequenzanalysen anhand der längsten möglichen, kodierenden Region der mRNA erstellt. Bei den mRNA-Sequenzen des Hamsters und der Ratte werden keine Angaben auf eine Vollständigkeit gemacht. Die Maus mRNA-Sequenz ist in der NCBI-Datenbank als vollständiges Transkript annotiert. Diese Annotation beruht auf der „Oligo-Capping“-Methode der cDNA-Erstellung (diese Methode wurde beschrieben von (Maruyama and Sugano, 1994; Suzuki et al., 1997)). „Oligo-Capping“ führt jedoch zu einer Fehlerrate von bis zu 20 % (persönliche Information von Th. Werner und M. Scherf), eine experimentelle Bestätigung des tatsächlichen TSS ist demzufolge nötig um das Maustranskript als 5' vollständig annehmen zu können.

Solange die eigentlichen, zu KIAA0592 homologen Proteine in den einzelnen Spezies (Maus, Ratte, Hamster) nicht direkt nachgewiesen werden können und die Sequenzinformationen mit einer Fehlertoleranz gesehen werden müssen, kann keine endgültige Aussage über die vollständige Proteinsequenz getroffen werden.

Die Aminosäuresequenz von Risp liegt in einem Bereich des C-Terminus von KIAA0592, für den keine ausgedehnte Sekundärstruktur vorhergesagt werden kann, der aber in den untersuchten orthologen Proteinen deutlich konservierte Domänen aufweist. Die durchgeführten Sequenzanalysen sowie Experimente zur Detektion der RNA konnten ausschließen, dass diese cDNA ein separates Protein bzw. eine separate mRNA darstellt. Die Risp-Aminosäuresequenz liegt also nur im Zusammenhang mit der KIAA0592komplett-Gesamtsequenz vor. Bei der ursprünglich identifizierten

cDNA handelt es sich demnach um einen unvollständigen Sequenzbereich von KIAA0592.

5.3 Die genomische Organisation von KIAA0592 ist konserviert

Die Kartierung des KIAA0592-Gens auf zwei unterschiedliche Genomcontigs stellte sich auf Grund der hohen Identität der Intronabschnitte neben den eigentlich kodierenden Bereichen als wahrscheinliche doppelte Listung in den DNA-Datenbanken heraus. Intronsequenzen unterliegen selbst bei identischen Genkopien in ein und dem selben Genom nicht einem Konservierungsdruck. Somit kann die hohe Identität dieser Bereiche wahrscheinlich durch eine fehlerhafte Zusammensetzung bzw. Duplikation eines Genombereiches erklärt werden und spiegelt nicht zwei Genkopien wider. Dies lässt den Schluss zu, dass das KIAA0592-Gen anhand der bisher verfügbaren Genominformationen als einzelne Kopie auf dem menschlichen Chromosom 10 im Bereich q11.22 vorliegt und sich über die kartierten 65 kbp mit 30 Exons verteilt (Kap. 4.1 und 4.2).

Der eigentliche Startpunkt der Transkription (TSS) konnte durch *in silico* Analysen nicht eindeutig festgelegt werden. Zur Identifikation von Genen, inklusive des Transkriptionsstarts und der regulatorischen Sequenzen, existieren verschiedene Programme (GENSCAN, Promotor 2.0, PromoterInspector). Da der TSS aber in eukaryotischen Genen nicht an spezifischen Sequenzen abgeleitet werden kann, sind diese Vorhersagen nur im Zusammenhang mit experimentellen Daten, wie zum Beispiel Primer-Extensionsstudien, zur Identifikation der TSS zu verwenden. Beispielsweise zeigten manche Programme (Promotor 2.0 (Knudsen, 1999)) in dem Sequenzbereich, welcher der KIAA0592-cDNA entspricht, bis zu 16 TSS, die mit einer angegebenen hohen Wahrscheinlichkeit genutzt werden könnten. Von dem Programm Eldorado wurde auf dem genomischen Bereich, der durch KIAA0592 kartiert ist, zwei TSS erkannt. Beide liegen aber innerhalb der mRNA-Sequenz von KIAA0592 und können deshalb also nicht deren Transkriptionsstart darstellen. Zusammen mit der Detektion einer zwischen 4,5 und 4,9 kb großen mRNA im Northern Blot kann aber davon ausgegangen werden, dass das Transkript nicht weiter als 100-200 bp stromaufwärts der publizierten KIAA0592-cDNA beginnt abgelesen zu werden. Dies würde neben den zusätzlichen 57 bp der komplettierten KIAA0592-Sequenz noch einen 5' untranslatierten Bereich erlauben, wie er in den meisten eukaryotischen Transkripten zu finden ist (Makalowski, 2001). Bei dem KIAA0592-Gen könnte dieser 50-150 bp groß sein. Weitere mögliche TSS innerhalb des KIAA0592-Genbereiches, die möglicherweise zu kürzeren Transkripten führen

würden, konnten experimentell ausgeschlossen werden. Northern Blot-Analysen in der vorliegenden Arbeit (Kap. 4.3.2) und ebenso in einer früheren Arbeit (Ceccherini-Silberstein, 2001) ergaben nur eine einzige, spezifisch detektierte mRNA für KIAA0592, obwohl spezifische Sonden verwendet wurden, die an unterschiedlichen Bereichen von KIAA0592 hybridisieren.

In dem Genombereich des Chromosoms 10, der durch die KIAA0592-mRNA kartiert werden konnte, überlagern sich zusätzlich drei Exon:Intron-Strukturen verschiedener annotierter Transkripte. Zwei dieser Transkripte umfassen einen fast ebenso langen primär transkribierten Bereich wie KIAA0592 mit 30 (XM_051956) und 28 (AK01686) Exons. Ein weiteres primäres Transkript enthält 14 Exons (AK001545). Die Exons überlappen fast vollständig mit dem für die 30 KIAA0592-Exons kartierten Chromosomenbereich. Die Annotation von zugehörigen TSS beruht wiederum auf der „Oligo-Capping“ Methode (Maruyama and Sugano, 1994; Suzuki et al., 1997). Die Gruppe um Suzuki et al. (Suzuki et al., 2002) beschreibt allerdings, dass 34 % der von ihnen untersuchten 7889 Gene der Referenzsequenzen (RefSeq-Datenbank, NCBI) 5' unvollständige waren (Suzuki et al., 2002). Dadurch ist es zu erklären, dass jedes der ansonsten sehr ähnlichen Transkripte an einer unterschiedlichen TSS beginnt, die zum Teil inmitten eines Exons eines anderen Transkriptes liegt. Die Annotation ist demnach nur unter Vorbehalt weiterer experimenteller Untersuchungen zu sehen. Dies lässt wiederum, wie schon anhand der Proteinsequenzen vermutet, den Schluss zu, dass es sich bei den annotierten Exon:Intron-Strukturen um ein langes Primärtranskript, nämlich KIAA0592, handelt. Risp liegt exakt auf dem für KIAA0592 kartierten Genbereich und endet mit dem Exon 29. KIAA0592 enthält ein weiteres Exon, das einen 3' untranslatierten Bereich mit einem Polyadenylierungssignal auf mRNA-Ebene enthält (Kap. 4.2.1).

Untersuchungen nach regulatorisch wirksamen Regionen des KIAA0592-Genabschnittes ergaben mehrere S/MARs. Diese Regionen in verschiedenen Introns des KIAA0592-Gens und eines stromaufwärts liegenden Transkriptes des selben Chromosomenbereichs könnten die DNA an der Kernmatrix verankern. Dadurch würden die potenziellen Promotorbereiche vor den beiden Genen und der größte Teil der kodierenden Exons als Schleifen frei zugänglich für Transkriptionsfaktoren und für Polymerasekomplexe werden. Dies könnte zur Regulation der Expression der anliegenden Gene beitragen (Laemmli et al., 1992; Liebich et al., 2002; Pikaard, 1998). Diese vorhandenen S/MARs könnten ein Zeichen für eine permanente transkriptionelle Aktivität sein (Schubeler et al., 1996), die auch durch den Nachweis der Expression in den unterschiedlichsten Geweben unterstützt wird (Nagase et al., 1998a). Die Anzahl der gesamten S/MARs wurde zum Beispiel für das Chromosom 22 geklärt (Frisch et al., 2002). Hier sind auf einer Länge von 47 Mbp bisher 795 Gene

(NCBI) annotiert und es wurden 1198 S/MARs ermittelt. Theoretisch lässt sich daraus eine Häufigkeit von einem S/MAR alle 42,7 kbp ableiten. Ich gehe hier davon aus, dass sich daraus, eine ähnliche Verteilung an S/MARs ergibt wie auf Chromosom 22. Das Chromosom 10 hat bei 135 Mbp 1198 annotierte Gene. KIAA0592 zeigte je zwei Cluster aus zwei S/MARs ca. 40 kbp voneinander entfernt (Kap. 4.2.1). Dies entspricht der aus der Anzahl errechneten Verteilung für Chromosom 22. Die Cluster im KIAA0592-Gen könnten einer Verstärkung der Bindung dienen, aber auch falsch positive Resultate der SMARTest-Software (Genomatix) darstellen.

Die experimentelle Bestimmung der regulatorischen Sequenzen von KIAA0592 ergab, dass der Bereich inklusive 950 bp stromaufwärts der kodierenden Sequenz von KIAA0592 Promotoreigenschaften besitzt (Kap. 4.5). Ein weiterer Bereich stromaufwärts bis zu 2650 bp führt zu einer Verminderung des Effekts der Transkriptionsaktivierung. In dem Bereich 600 bp vor dem KIAA0592-Gen sind verschiedene genassoziierte Promotorbereiche annotiert. Diese Bereiche sind durch die Identifikation der potenziellen Transkriptionsstartstellen der verschiedenen mit KIAA0592 überlappenden Transkripte mittels „Oligo Capping“ im 5' Bereich der Gene vorausgesagt bzw. als experimentell verifiziert annotiert (ElDorado). Neben der beschriebenen Methode des „Oligo Cappings“ war es mir nicht möglich, eine weitere experimentelle Verifikation dieser Promotoren nachzuvollziehen. Die Annotationen beruhen dabei rein auf der Annahme, dass dem Gen direkt vorausgestellt bis zu 600 bp stromaufwärts die hauptsächlich als Promotor fungierende Sequenz liegt. Dies sagt nur wenig über die reelle Lage und das Ausmaß des Promotors oder über seine funktionalen Bestandteile aus. In den 2650 bp stromaufwärts können vier bekannte Promotormodule wiedergefunden werden. Keines dieser Module liegt in dem 600 bp umfassenden als Promotor annotierten Bereich (ElDorado). Eines dieser Module befindet sich in dem experimentell getesteten 950 bp großen Sequenzbereich (Kap. 4.5.2). Dieses Modul GATA_HNF1_01 ist im Zusammenhang mit der menschlichen Lactase-Phlorizin-Hydrolase beschrieben worden (Krasinski et al., 2001). Dabei handelt es sich um ein intestinales Enzym. Das Modul kommt statistisch 66 mal in 100000 bp des Genoms vor und kann 99 mal in annotierten menschlichen Promotoren gefunden werden (ModelInspector, Genomatix). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen KIAA0592 und diesem Enzym bzw. den Genen, die ebenfalls dieses Modul in ihren Promotoren tragen, anhand der Literatur und den verfügbaren Datenbanken hergestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die eigentlich für die transkriptionelle Aktivität des KIAA0592-Gens verantwortlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotormodule noch nicht beschrieben wurden. Es kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Promotor in der Basensequenz 950 bp stromaufwärts des Gens kodiert ist. Ob nun die annotierten Bereiche (600 bp) ausreichen oder die gesamten 950 bp nötig sind, muss in weiteren

Promotorstudien ermittelt werden. Eine reine Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen, deren Akkumulation oder bestimmter Muster führte nicht zur Eingrenzung spezifischer regulatorischer Sequenzen. Ein Muster an TF-Bindungsstellen könnte nur durch einen Vergleich mit homologen Genen im Menschen oder aber orthologen Genen in anderen Spezies ermittelt werden. Bekannte homologe Gene im menschlichen Genom waren bisher nicht zu finden. In den Genomen der Spezies mit vergleichbaren Proteinsequenzen fehlten bisher noch die korrekt annotierten Genombereiche, um dort nach gemeinsamen Mustern an TF-Bindungsstellen zu forschen. Dies sollte sich allerdings in näherer Zukunft ändern und so könnten dann auch die tatsächlichen, auf den KIAA0592-Promotor wirkenden Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass eine Risp-entsprechende genomische DNA-Sequenz in verschiedenen Spezies detektiert werden kann. Die Detektion der Sequenzen war trotz geringer Stringenz sehr schwach. Interessanterweise konnte hierbei keine DNA-Sequenz des Rhesus-Affen (*M. mulatta*) spezifisch detektiert werden. Jedoch zeigten Mensch, Maus, Ratte, Hund und Rind eine Risp/KIAA0592-spezifische Bande (Ceccherini-Silberstein, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Homologie des KIAA0592-Gens bzw. des Proteins zwischen den Spezies Mensch (*H. sapiens*), Ratte (*R. norvegicus*), Maus (*M. musculus*) und dem chinesischen Streifenhamster (*C. griseus*) anhand *in silico* Analysen der verfügbaren Protein- und DNA-Sequenzen gezeigt (Kap. 4.1.2 u. 4.2.2). Für die weiteren Spezies liegen noch keine ausführlichen Genomsequenzen vor. Nach den Expressionsergebnissen (Kap. 4.3 u 4.4) und anhand des Sequenzvergleichs der vorhandenen Spezies kann aber vermutet werden, dass zu KIAA0592 orthologe Gene in allen Säugern exprimiert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass KIAA0592 eine konservierte zelluläre Funktion ausüben könnte.

5.4 Die Expression von KIAA0592

Expressionsanalysen auf cDNA/mRNA-Ebene zeigten, dass das KIAA0592-Trankript in allen getesteten menschlichen Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden kann. Hierbei wurde das Vorhandensein zumindest des Risp-entsprechenden Teils der mRNA schon durch die ursprünglich publizierende Gruppe in Herz, Lunge, Gehirn, Plazenta, Leber, Bauchspeicheldrüse, Thymus, Milz, Nieren, Prostata, Hoden, Ovarien, Dünndarm und den Skelettmuskeln nachgewiesen (Kap. 4.3 und (Nagase et al., 1998a); HUGE-Datenbank). Interessanterweise wurde hierfür eine Sequenz durch

RT-PCR amplifiziert, die einem kleinen Teil (162bp) der Risp-Sequenz entspricht. Dies stellt den äußerst 3' liegenden Teil der mRNA von KIAA0592 dar. In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorhandensein dieses Risp-Abschnittes mit einem rein in der KIAA0592-Sequenz vorhandenen mRNA-Bereich verglichen werden (Kap. 4.3). Die Expression wurde anhand von verschiedenen Zelllinien getestet und es zeigte sich, dass ebenso der 5' Bereich und der mittlere Teil von KIAA0592 nachgewiesen werden konnten.

Die Größe der gesamten mRNA wurde durch eine KIAA0592-spezifische Probe im Northern Blot ermittelt. Dabei zeigte sich, genauso wie durch eine Risp-spezifische Probe, eine knapp unter 4,9 kb liegende einzelne Bande. Eine mögliche zweite Bande eines kürzeren Transkriptes oder Spleißproduktes (Ceccherini-Silberstein, 2001) konnte nicht ermittelt werden. Im Zusammenspiel mit den *in silico* Daten kann auch nicht von einem kürzeren Transkript ausgegangen werden. Alternatives Spleißen konnte nicht detektiert werden, kann aber anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden und müsste gezielt experimentell untersucht werden. Die Detektion der mRNA auf einem Northern Blot ist hierfür allerdings zu schwach. Nach den vorliegenden Daten müsste davon ausgegangen werden, dass ein zweites Transkript oder Spleißprodukt in einer geringeren Menge vorliegt und dies würde dann unter der Detektionsgrenze des verwendeten experimentellen Northern Blot-Ansatzes liegen. Die stärkste detektierte Expression der mRNA im Northern Blot (Kap. 4.3.2) trat bei der Astrozytom-Zelllinie U87 MG auf. Dies spiegelt sich in der Detektion des endogenen KIAA0592-Proteins in U87 MG wider (Kap. 4.4.2).

Die Detektion der Expression des Proteins durch spezifische Antikörper zeigt wiederum keinen Hinweis auf eine exprimierte verkürzte Version des KIAA0592komplett-Proteins. Ein Vergleich der Expression von endogen in der Zelle vorhandenem Risp/KIAA0592 stellte sich als schwierig heraus, da die endogene Expression schwach zu sein scheint. Im Western Blot oder durch Immunfärbung an fixierten Zellen konnte endogen exprimiertes KIAA0592 in HEK293-, U87 MG-, U251 MG- und HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis ist demnach nur bedingt quantitativ zu sehen, da wahrscheinlich an der Detektionsgrenze des endogenen Proteins durch den verwendeten spezifischen Antikörper gearbeitet wurde. Es kann aber gesagt werden, dass, wie durch die Analyse der mRNA-Expression und des Promotors vorauszusehen war, das endogene Protein nur schwach exprimiert wird.

Die Klonierung eines Expressionskonstruktes stellte sich als äußerst schwierig heraus. Verschiedenste Versuche, die komplette Sequenz von KIAA0592 in einen Expressionsvektor zu klonieren, scheiterten dadurch, dass keine Ligation der Fragmente oder im Folgenden keine Amplifikation des Vektors in Bakterien möglich war. Da alle Reagenzien und Methoden getestet und funktionsfähig waren, liegt die

Vermutung nahe, dass die anfänglich verwendete Kombination aus Bakterienstämmen und Vektoren ungünstig für die Bakterien selbst war und diese deshalb die Plasmidvervielfältigung ungenügend ausführten. Vollständig erklärt werden konnte das Phänomen jedoch nicht.

Das KIAA0592-Protein wird ubiquitär in verschiedenen Zellen und Geweben und als orthologes Protein in unterschiedlichen Spezies exprimiert. Dies ist ein Indiz für eine konservierte wichtige Funktion in den Zellen. Obwohl die Expression des Proteins natürlicherweise auf einem niedrigen Niveau reguliert zu sein scheint, bewirkte eine Überexpression bislang keine detektierbaren Veränderungen.

Trotz errechneter Proteingröße von 148 kDa für KIAA0592 komplett konnte im Western Blot spezifisch ein Protein von ca. 200 kDa nachgewiesen werden. Die Möglichkeit ausgedehnter posttranslationaler Modifikationen der Proteinprimärsequenz konnte durch die Detektion einer Vielzahl von Signalsequenzen innerhalb der KIAA0592-Proteinsequenz vorhergesagt werden. Phosphorylierung, Sulfonierung und Myristoylierung tragen erheblich zur Veränderung der biochemischen Eigenschaften und des Molekulargewichtes einer Aminosäurekette bei. Tatsächliche Modifikationen und biochemische Eigenschaften müssten in weiteren experimentellen Ansätzen untersucht werden. Eine teilweise Sequenzierung der Aminosäuresequenz und eine Untersuchung der Modifikationen könnten weitere Aufschlüsse über die Eigenschaften von KIAA0592 geben.

5.5 Der Zusammenhang zwischen Risp, Crm1 und Rev

Durch Interaktionen zwischen Proteinen oder zwischen Nukleinsäuren und Proteinen werden in der lebenden Zelle alle nötigen Informationen vermittelt und strukturelle und funktionelle Zellbestandteile entstehen. Dabei kann es sich um Enzyme und deren Substrate, Chaperone und die zu faltenden Proteine, Transportproteine und deren Last, aber auch Strukturproteine und sich durch Interaktion daran bewegende Proteine oder Filamente, die aus vielen Untereinheiten entstehen, handeln.

Die für die Rev-Funktion wichtigsten Interaktionen sind wahrscheinlich die schon beschriebenen direkten Bindungen an die Kernexport- und Importrezeptoren Crm1 (Askjaer et al., 1998; Daelemans et al., 2002; Fornerod et al., 1997a; Fukuda et al., 1997; Henderson and Percipalle, 1997; Neville et al., 1997; Stade et al., 1997) und Importin β (Henderson and Percipalle, 1997; Neville et al., 1997; Palmeri and Malim, 1999; Truant and Cullen, 1999; Ullman, Powers, and Forbes, 1997). Mit beiden geht Rev eine direkte Bindung ein, die jeweils essentiell für die Funktion von Rev ist. Für

beide Proteine wurden spezifische Bindungsstellen in Rev, die NES- und NLS-Sequenzen, ermittelt.

Durch die ersten Interaktionsversuche ließ sich zeigen, dass Risp ebenfalls direkt an Rev bindet. Die Interaktion wurde durch die Rev-Mutation M5 im Bereich des NLS/NOS oder die Mutation SLT40 im Bereich der zweiten zur Multimerisierung nötigen Aminosäuresequenz unterbunden. Diese veränderten Aminosäuren engen den Bereich ein, der für die Bindung von Rev an Risp nötig ist. Deletionsmutanten von Risp zeigten im Hefe-System, dass die Sequenzabschnitte von AS 74-133 zur Interaktion mit Rev nötig waren (Ceccherini-Silberstein, 2001). Diese Sequenz entspricht den AS 1275 bis 1334 am C-terminalen Ende des vollständigen KIAA0592-Proteins.

Interessanterweise fehlen in genau diesem Bereich mehrere Aminosäureabschnitte in der orthologen Sequenz der Maus. Interaktionsstudien zwischen Rev und den vergleichbaren murinen Sequenzen bzw. der Hamstersequenz würden hier zeigen, ob diese Unterschiede zwischen den Spezies auch einen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit mit Rev haben könnten. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der reduzierten Funktionalität von Rev in Mauszellen (Marques et al., 2003) und der veränderten Sequenz des KIAA0592/Risp-Homologs in der Maus. Es wurde beschrieben, dass im C-terminalen Teil von Rev der funktionale Hintergrund dieser Einschränkung begründet liegt. Die Risp:Rev-Interaktionsstudien können nicht ausschließen, dass Risp auch am C-terminalen Teil mit Rev interagiert. Bei der fortschreitenden Vervollständigung der annotierten Sequenzen könnten sich diese fehlenden Aminosäurebereiche allerdings auch noch als Fehler in der annotierten Sequenz herausstellen. Der beschriebene Proteinabschnitt zeigt ansonsten keine auffälligen Sequenzbestandteile und ist bis auf die kurzen fehlenden Bereiche in der murinen Sequenz gut konserviert zwischen den untersuchten Spezies.

Risp zeigt keine Bevorzugung eines funktionellen oder inaktiven Rev-Proteins, da es an Wildtyp-Rev sowie verschiedene inaktive (M4) oder sogar transdominant negative (M10bl) Mutanten bindet (Kap. 4.6). Die Interaktion des Hefe 2-Hybridsystems beruht auf der Aktivierung eines Reportergens im Kern. Hierfür sind die Expressionskonstrukte so konstruiert, dass in den Fusionsproteinen Kernlokalisierungssignale vorhanden sind. Somit kann in diesen Versuchen der Einfluss der Lokalisationsfähigkeit des wildtypischen Rev und der Mutanten (M4 = nukleär + zytoplasmatisch, M5 = vorwiegend zytoplasmatisch, M10bl = nukleär und SLT40 = nukleär) unabhängig von den 2-Hybridfusionskonstrukten nicht ermittelt werden. Die intrazelluläre Lokalisation der Hefe 2-Hybridfusionsproteine wurde bisher nicht getestet. Es konnte also nicht zweifelsfrei ermittelt werden, ob die Interaktion im Nukleus stattfindet oder ob nach einer Interaktion im Zytoplasma der Komplex in den Zellkern transportiert wird und dort das Reportergen aktiviert. Im Gegensatz hierzu

konnten die Fusionsproteine des Säuger 2-Hybridsystems in den Zellen lokalisiert werden (Kap. 4.7.1) und zusätzlich die Funktionalität der Rev-Proteine gezeigt werden (Kap. 4.7.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Gal4-Risp-Fusionsproteine trotz der beschriebenen NLS-Aktivität von Gal4 immer noch hauptsächlich im Zytoplasma vorliegen und nur ein Teil im Kern ist. VP16-Rev hingegen lokalisiert vornehmlich Rev-typisch im Nukleoplasma und auch sichtbar in den Nukleoli. Die gezeigte Interaktion zwischen Rev und Risp unter diesen Voraussetzungen kann auf zweierlei Weise ablaufen. Eine Interaktion im Kern wäre möglich, wenn trotz der hauptsächlich Lokalisation von Gal4-Risp im Zytoplasma dieses Fusionsprotein durch die NLS von Risp oder Gal4 zum Teil in den Kern transportiert würde und dort mit VP16-Rev interagiert. Durch die Bindung an VP16-Rev könnte der Komplex dann an die Gal4-Bindungsstellen des Reportergens rekrutiert werden und die Transkription aktivieren. Auch wenn Gal4 keinen Einfluss auf die sichtbare Lokalisation von Risp hat, könnte die NLS-Eigenschaft von Risp zu einer Kernlokalisation führen. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass Gal4-Risp selbst nicht in der Lage ist, den Kern zu erreichen, aber durch die Interaktion mit VP16-Rev in den Kern gelangt. Rev besitzt als unfusioniertes oder mit GFP-fusioniertes Protein „Shuttle“-Fähigkeiten. Inwieweit der zusätzliche VP16-Anteil bzw. die zusätzliche SV40-NLS diese Fähigkeiten beeinflusst oder verändert, müsste separat untersucht werden. Die in Kapitel 4.7.2 gezeigte Funktionalität von VP16-Rev spricht dafür, dass dieses Fusionsprotein ebenfalls noch über „Shuttle“-Fähigkeiten verfügt. Ein Testsystem, in dem ausschließlich die Kernexportfähigkeit neben dem Einfluss zweier starker NLS (Rev und SV40) untersucht werden kann, ist mir nicht bekannt. Möglicherweise kann ein statistisch signifikanter Unterschied nach einer Behandlung mit Leptomycin B errechnet werden. Interessant hierbei wäre es zu untersuchen, ob die Rev:Risp-Interaktion ebenfalls unter dem Einfluss von Leptomycin B abläuft.

Bei der Betrachtung der Interaktionsstudien des Säuger 2-Hybridsystems muss berücksichtigt werden, dass dieses System nur bedingt für Rev geeignet scheint. So konnte die Interaktion zwischen Rev und Risp aus der Hefe hier ebenfalls gezeigt werden, aber es ließ sich keine Multimerisierungsreaktion von Rev nachweisen. Dies könnte durch die wahrscheinlich direkte Interaktion von Rev mit VP16 erklärt werden, wodurch Vernetzungen der Proteine von komplexer Natur entstehen könnten, die einer Aktivierung des Reportergens durch räumliche Strukturen oder aber auch Behinderung des intrazellulären Transportes entgegenwirken. Abbildung 5.5.1 zeigt mögliche Proteininteraktionen von VP16-Rev und Gal4-Rev unter der Annahme, dass Rev mit sich selbst interagieren kann, aber auch mit VP16. Die Abbildung ist vereinfacht, da weitere Interaktionen mit anderen Faktoren hier nicht berücksichtigt werden.

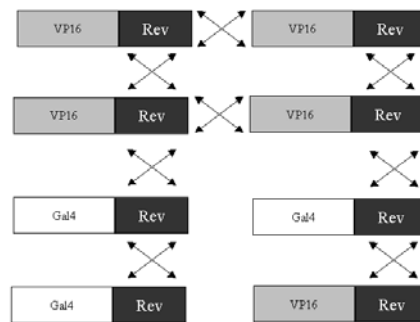


Abbildung 5.5.1: Mögliche Vernetzung der Fusionskonstrukte von Rev des Säuger 2-Hybridsystems (VP16-Rev = grau/schwarz, Gal4-Rev = weiß/schwarz). Rev ist in der Lage zur Multimerisierung (Brice, Kelley, and Butler, 1999; Thomas et al., 1998) und kann wahrscheinlich direkt an VP16 binden. Die Kreuze zeigen mögliche Interaktionen. Die Vernetzung könnte theoretisch beliebig durch die angezeigten Interaktionen fortgeführt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die direkte Bindung von Gal4-Risp an VP16-Crm1. Die Lokalisationsversuche unter dem Einfluss von Leptomycin B hatten bereits darauf hingedeutet, dass der Kernexport von Risp Crm1-abhängig ist. Die Säuger 2-Hybridversuche zeigten nun, dass eine direkte Interaktion stattfindet. Da in allen Säugerzellen Crm1 aktiv ist, wäre es möglich, dass die beobachtete Risp:Rev-Interaktion in der Realität als trimerer Komplex abläuft. Risp bindet im Bereich der NLS an Rev und würde somit eine Rev:Crm1-Interaktion nicht behindern. Der minimale Rev-bindende Abschnitt in Risp ist noch nicht ermittelt. Deletionskonstrukte zeigten, dass Rev zwischen den Aminosäuren 39 und 133 bindet (Ceccherini-Silberstein, 2001). Dieser Teil überschneidet sich mit der ermittelten NES-Peptidsequenz von Risp (AS 86 bis 105), welche die Interaktion mit Crm1 vermitteln sollte. Eine weitere Eingrenzung der Rev-Bindungsstellen könnte zeigen, ob Risp gleichzeitig an Crm1 und Rev binden kann.

Folgende Zusammenhänge könnten also bestehen (Abb. 5.5.2):

- A. Risp könnte direkt an Rev binden.
- B. Die Interaktion könnte rein über eine Brücke aus einem Crm1-Protein vermittelt werden.
- C. Rev und Risp könnten miteinander interagieren und jeweils mit Crm1.

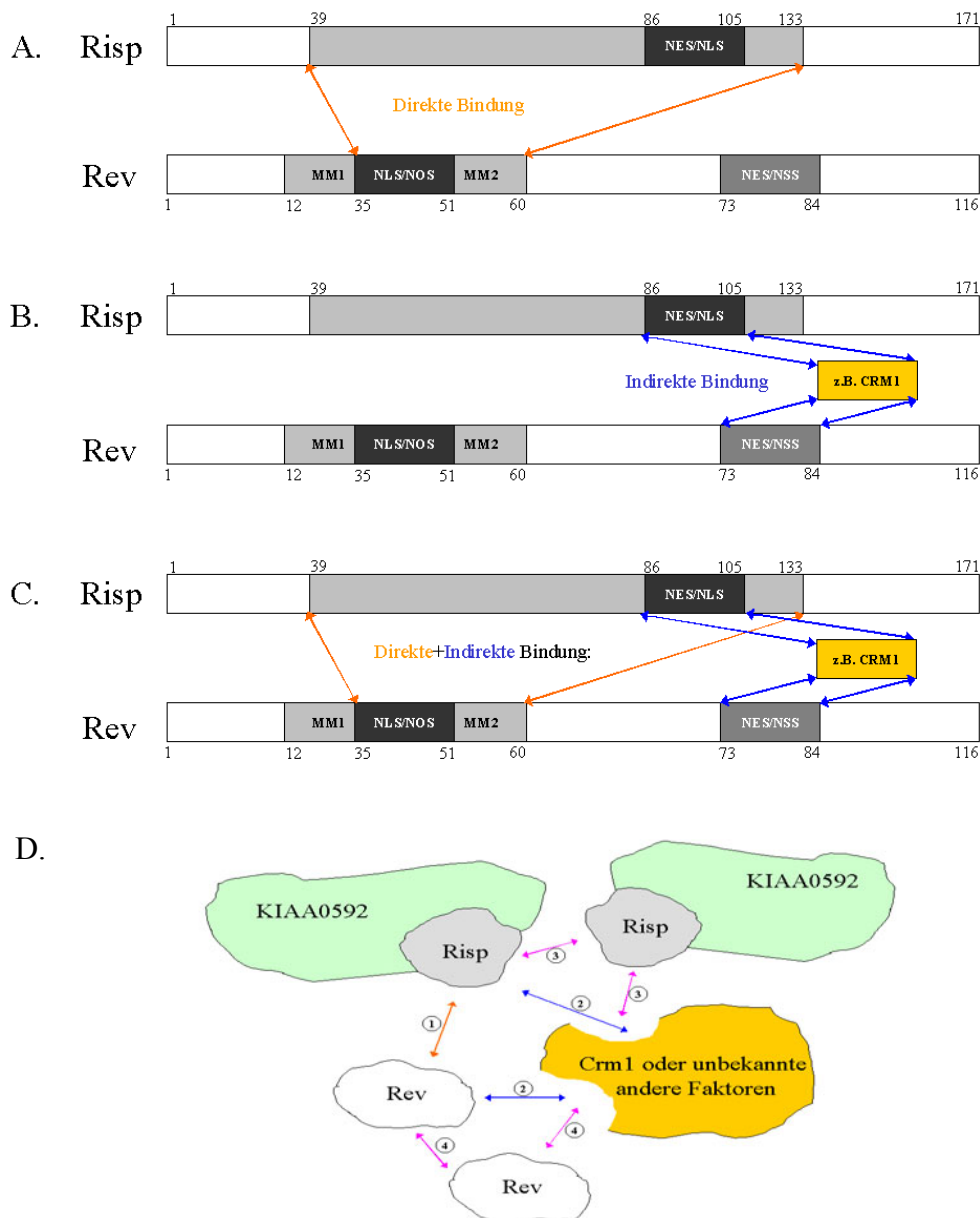


Abbildung 5.5.2: Mögliche Interaktionsarten von Rev und Risp bezogen auf die beteiligten Domänen (A-C): A) Formation einer direkten Bindung zwischen Rev und Risp (orangefarbene Pfeile) anhand der ermittelten Interaktionsbereiche (Ceccherini-Silberstein, 2001). B) Bildung eines zusammenhängenden Komplexes zwischen Rev, Risp und Crm1 ausschließlich durch eine Crm1-Brücke (blaue Pfeile, orangefarbene Kästen). Beide Proteine (Rev, Risp) binden hierbei nur an Crm1. C) Komplexbildung zwischen Rev, Risp und Crm1 durch Bindungen aller Proteine aneinander. D) Vereinfachter graphischer Überblick der möglichen Proteinbindungen zwischen Risp (grau) und Rev (weiß) direkt (1), über Crm1 (2) oder durch weitere Risp-(3) oder Rev-Proteine (4). In dieser Graphik wird berücksichtigt, dass Risp ein Teil vom KIAA0592 (grün) ist. Anstatt Crm1 wäre auch die Bindung über noch unbekannte weitere Faktoren denkbar. (NES = Kernexportsignal, NLS = Kernlokalisierungssignal, NOS = nukleoläres Lokalisierungssignal, NSS = Kernshuttlingssignal (Ceccherini-Silberstein, 2001), MM1/MM2 = Multimerisierungsdomänen)

Die Tatsache, dass es bisher nicht möglich war, eine Risp:Rev-Interaktion *in vitro* zu ermitteln (Daten nicht gezeigt), könnte darauf hin deuten, dass Crm1 eine Rolle bei der bewiesenen Risp:Rev-Verbindung spielt. Eine rein Crm1-vermittelte Bindung kann nicht völlig ausgeschlossen werden, allerdings müsste humanes Crm1 hierbei ebenso reagieren wie das Homolog der Hefe, da die Risp:Rev-Interaktion in beiden Systemen beobachtet werden konnte. Zusätzlich müsste diese Bindung aus drei Proteinen im Kern bestehen und stark genug sein, um in den 2-Hybridsystemen die Reportergene anzuschalten.

Weitere bisher unbekannte Faktoren könnten bei der Interaktion von Risp mit Rev ebenso eine Rolle spielen (D). Bekannte Rev-bindende Faktoren, für die zugleich bewiesen wurde, dass sie direkt mit Crm1 interagieren, sind Importin β (Iovine and Wente, 1997), hRip/Rab (Bogerd et al., 1995) und NLP-1 (Farjot, Sergeant, and Mikaelian, 1999). Diese Faktoren sind wiederum eng mit dem „Shuttle“-Verhalten von Rev verbunden. Risp hat zwar die Fähigkeit, in den Kern zu gelangen bzw. aus dem Kern exportiert zu werden, was es mit dem Kerntransport verknüpft, jedoch ist es nicht speziell mit den Kernporenkomplexen verbunden. Untersuchungen einer Interaktion von Risp bzw. KIAA0592 mit den bekannten Bestandteilen des Kernporenkomplexes (z.B. Nukleoporine) oder anderen Bestandteilen des Kerntransportes (z.B. Importin β) könnte hier weiteren Aufschluss bringen, inwieweit Risp, Rev und Crm1 in ihrer Funktion verbunden sind.

Welchen Einfluss die gesamte Proteinsequenz von KIAA0592 komplett auf die Bindungsfähigkeit mit Rev hat, lässt sich nur vermuten. In dem Risp entsprechenden Bereich von KIAA0592 sind nur geringe Sekundärstrukturen *in silico* nachzuweisen. Inwieweit das Protein aber weitere räumliche Strukturen ausbildet und wie die untersuchten Bindungssequenzen in dieser räumlichen Anordnung liegen, bleibt offen. Um die Bindungseigenschaften von KIAA0592 zu untersuchen, müssten die 2-Hybridversuche mit der vollständigen Sequenz oder Koimmunpräzipitationen der Proteine durchgeführt werden. In beiden Fällen könnte ebenfalls die Interaktion von KIAA0592 mit Crm1, aber auch mit anderen zellulären Proteinen untersucht werden.

5.6 Die Lokalisation von Risp und deren Einfluss auf HIV-1 Rev

Der Risp-Proteinteil lokalisiert als Fusionsprotein mit GFP überwiegend im Zytoplasma, obwohl auch 37 % der Gesamtproteinmenge im Kern nachgewiesen werden konnte. Risp reagiert mit einer veränderten Lokalisation auf die Behandlung mit Leptomycin B. Diese Chemikalie inhibiert spezifisch den Crm1-abhängigen Kernexport von Proteinen (Bogerd et al., 1998; Kudo et al., 1998; Wolff, Sanglier, and

Wang, 1997). 10 % der Proteinmenge von RispGFP sind dadurch in den Kern verlagert (nun 47 % nukleär, Kap. 4.10.1). Diese Beobachtung könnte auf zwei unterschiedliche Arten zustande kommen.

1. Die Lokalisation von RispGFP nach der Behandlung mit LMB entspricht nun einer ausschließlich durch Diffusionseinflüsse hervorgerufenen Verteilung des Risp-Proteins. Der Kernexport durch Crm1 verlagert im natürlichen Zustand diese Lokalisationsverteilung zu Gunsten des Zytoplasmas. Risp enthält kein aktives Signal zum Kernimport. Da dies der Verteilung von GFP entspricht könnte es sich hierbei also um keine Akkumulation sondern um reine Diffusion handeln.

2. Risp enthält ein oder mehrere aktive Transportsignale und wird im normalen Gleichgewichtszustand ständig gleichzeitig in den Kern und aus dem Kern transportiert. Das Gleichgewicht liegt dabei auf der Seite des Zytoplasmas, also dominiert der Kernexport. Hemmt man nun den aktiven Kernexport von Risp, so agiert nur noch der aktive Import, der nun für die Veränderung der Proteinlokalisierung verantwortlich ist. Die Ergebnisse der Mikroinjektion von einem Risp-Peptid (Kap. 4.10.4) weisen darauf hin, dass Risp über aktive Signale, in diesem Fall in einer möglicherweise bifunktionalen Signalsequenz für den Kernexport und den –import, verfügt.

Eine Unterscheidung zwischen beiden Modellen ließe sich nur durch Lokalisationsexperimente eindeutig klären, die eine selektive und komplette Hemmung des Kernexportes oder des Kernimportes beinhalten müssten. Es fehlen hierfür die nötigen Inhibitoren, um die bekannten Transportwege zu hemmen. Alternativ könnte zwischen Diffusion und aktivem Transport durch die Erfassung von kinetischen Daten der Transportereignisse unterschieden werden (Anderson, 1983; Demart, 2003).

Zusätzlich kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem speziellen bifunktionalen Peptidsignal weitere, nicht detektierte NLS oder NES mit alternativen Transportwegen interagieren. Um die nukleozytoplasmatische Bewegung einschätzen zu können, wurde das Verhalten von Risp mit einem bekannten Protein, dem Interaktionspartner von Risp, Rev verglichen. Das grünfluoreszierende Protein GFP sollte in seiner Lokalisation ausschließlich von der Diffusion abhängig sein, da es mit ca. 30 kDa unter der in der Literatur postulierten Diffusionsgrenze (Adam, 2001; Gorlich and Kutay, 1999; Ribbeck and Gorlich, 2002) des Kernporenkomplexes liegt und keine NES oder NLS besitzt. Die Lokalisation von GFP lässt sich nicht durch die Behandlung mit LMB verändern. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ein Fusionsprotein aus vier GFP-Domänen (4GFP) sich ebenfalls zu ca. 41 % im Kern befindet. Da das 4GFP-Molekül allerdings ca. 110 kDa groß ist, sollte keine passive Diffusion in den Zellkern möglich sein. Die teilweise nukleäre Lokalisation ließe sich durch einen unbekannten Transportmechanismus erklären, aber auch durch die

Aneinanderreihung der vier GFP-Moleküle wie auf einer Perlenkette, so dass das Fusionsprotein zwar über ein hohes Molekulargewicht verfügt, aber trotzdem im Durchmesser noch durch den Kernporenkomplex passt. Zusätzlich könnte diese Lokalisation von 4GFP den Ursprung darin haben, dass nach der Zellteilung das Protein bereits in dem Bereich vorliegt, in dem sich der neue Kern bildet und somit durch die Kernmembran eingeschlossen wird. Jens Barthelmes zeigte in seiner Diplomarbeit, dass ein Fusionsprotein aus drei GFP-Domänen sich ebenso durch passive Diffusion verteilt, dass aber die Einstellung des Gleichgewichts mehr Zeit benötigt (Barthelmes, 2001). Die GFP-Moleküle sind hier Translokationskontrollen an denen der Basiswert der Diffusion abgelesen werden kann.

Wenn man nun davon ausgeht, dass das RispGFP-Fusionsprotein (ca. 50 kDa) ähnliche strukturelle Eigenschaften besitzt wie GFP, dann zeigt die LMB-Behandlung eine deutliche Verbindung mit dem Crm1-vermittelten Kernexport. Es kann aber daraus noch kein Schluss auf den Kernimport gezogen werden. Es stellt sich allerdings die Frage, warum ein Protein ein Kernexportsignal benötigt, wenn es, wie das KIAA0592komplett-Protein, rein durch das Molekulargewicht (der Aminosäuresequenz) von 148 kDa vom Kern ausgeschlossen sein sollte. Die Expressionsstudien von KIAA0592 zeigten eine deutliche Akkumulation im Zytoplasma (Kap. 4.4.3). Ein Kernexportsignal würde biologisch dann Sinn machen, wenn ein aktiver Transport aus dem Kern nötig ist. Dies könnte z.B. durch ein aktives Kernlokalisierungssignal der Fall sein. Bei Risp/KIAA0592 würde es sich damit um ein „Shuttle“-Protein handeln. In diesem Zusammenhang müssen nun die Signaleigenschaften der untersuchten Risp-Peptidsequenz (Kap. 4.10.4) betrachtet werden. Diese Versuche zeigten, dass diese Sequenz bestehend aus 21 Aminosäuren in der Lage ist ein gekoppeltes BSA-Protein und Farbstoffmoleküle in den Kern zu transportieren genauso wie aus dem Kern zu exportieren. Auffällig in diesen Experimenten war, dass das untersuchte Risp-Signalpeptid, ebenso wie das RevNES-Peptid beide Eigenschaften zeigte (Demart, 2003). Diese Ergebnisse sprechen wiederum dafür, dass Risp und möglicherweise auch KIAA0592 die Fähigkeit besitzen, unter bestimmten Bedingungen zwischen dem Zytoplasma und dem Kern zu pendeln.

Die Fähigkeit des intrazellulären Pendelns von Risp zusammen mit der Bindung an Rev, Crm1 und Risp selbst, stellte die Frage eines funktionalen Zusammenhangs dieser drei Proteine. Zuerst sollte die Frage geklärt werden, ob Risp und Rev homologe Funktionen ausüben (Kap. 4.10). Insbesondere wurde untersucht, ob die Proteinsequenz von Risp in der Lage ist, einem C-terminal verkürzten Rev-Protein (Rev1-54) die Fähigkeit zum Crm1-vermittelten Kernexport wieder zu geben. Diesem Rev-Fragment fehlt die gesamte Kernexportsequenz und die zweite der Multimerisierungsdomänen. Das Protein ist somit nicht mehr in der Lage, virale

mRNA zu binden und den Kern zu verlassen. Es wurde publiziert, dass mit verschiedenen Crm1-abhängigen Kernexportsignalen ein funktionsfähiges mRNA-Exportprotein, spezifisch für bestimmte mRNA, wie RRE-mRNA oder MS2-mRNA konstruiert werden kann (Yi, Bogerd, and Cullen, 2002). Diese Publikation kommt zu der Schlussfolgerung, dass Crm1-Rekrutierung nicht nur nötig, sondern alleine ausreichend für den spezifischen Kernexport von HIV RRE-mRNA durch Rev ist. Die Risp-Sequenz, mit der Fähigkeit zur Bindung an Crm1 und zur Interaktion mit sich selbst, müsste in der Lage sein, die Multimerisierung und den Kernexport in einem Fusionsprotein mit Rev1-54 zumindest teilweise zu übernehmen. Es zeigte sich hier, dass GFP-Fusionskonstrukte von Rev1-54 und Rev1-54Risp eine fast identische intrazelluläre Lokalisation, nämlich eine nukleäre Akkumulation wie Rev in HeLa-Zellen zeigten. Risp ist demnach nur bedingt in der Lage für einen Kernexport des Rev1-54RispGFP-Fusionsproteins zu sorgen.

Rev4GFP akkumuliert Rev-untypisch in HeLa-Zellen vornehmlich im Zytoplasma (Barthelmes, 2001) (Kap. 4.10.2). Diese Lokalisation kann durch verschiedene Aspekte dieses Fusionsproteins erklärt werden (Abb. 5.6.1). Zur Translokation durch den Kernporenkomplex müssen Proteine mit bestimmten Transportern interagieren. Für Rev sowie für GFP wurde die Fähigkeit zur Multimerisierung beschrieben (Brice, Kelley, and Butler, 1999; Jensen, Martini, and Schwartz, 2001; Madore et al., 1994; Phillips, 1997). Durch die Verknüpfung von nun vier großen GFP-Anteilen und dem stark zur Multimerisierung neigenden Rev können nun im Zytoplasma Komplexe entstehen, die sich aus mehreren Rev4GFP-Untereinheiten zusammensetzen (Reaktionsablauf R1). Dadurch ist es zum einen möglich, dass die Kernlokalisierungssignale durch andere Domänen der fusionierten Proteine soweit verdeckt werden, dass es zu einer starken Verringerung des Kernimportes führt. Wahrscheinlich ist, dass diese Aggregate nicht mehr oder nur ineffizient in den Zellkern importiert werden. Somit stehen nur wenige freie, einzelne Rev4GFP-Moleküle zum Kernimport zur Verfügung. Die Bildung solcher Komplexe würde somit das Gleichgewicht der intrazellulären Lokalisation von Rev4GFP zum Zytoplasma verschieben (R2). Nach einer Blockade des Exports durch eine Behandlung mit LMB gelangt nach zwei Stunden der überwiegende Anteil von Rev4GFP in den Kern. Das könnte darin begründet sein, dass entweder von den Komplexen dissoziierte Rev4GFP-Moleküle nun in den Kern importiert werden und dort bleiben, oder dass die Komplexe selbst langsam in den Kern gelangen. Dabei könnten die in Abbildung 5.6.1 beschriebenen Reaktionen ablaufen. Die bevorzugte Richtung des Transports bzw. der Interaktionen an den kritischen Punkten (R1, R2, R3, R4) ist dabei durch die unterschiedliche Länge der Reaktionspfeile angezeigt. Dies führt dann zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von Rev4GFP, welche aber durch LMB-Behandlung aufgehoben werden kann.

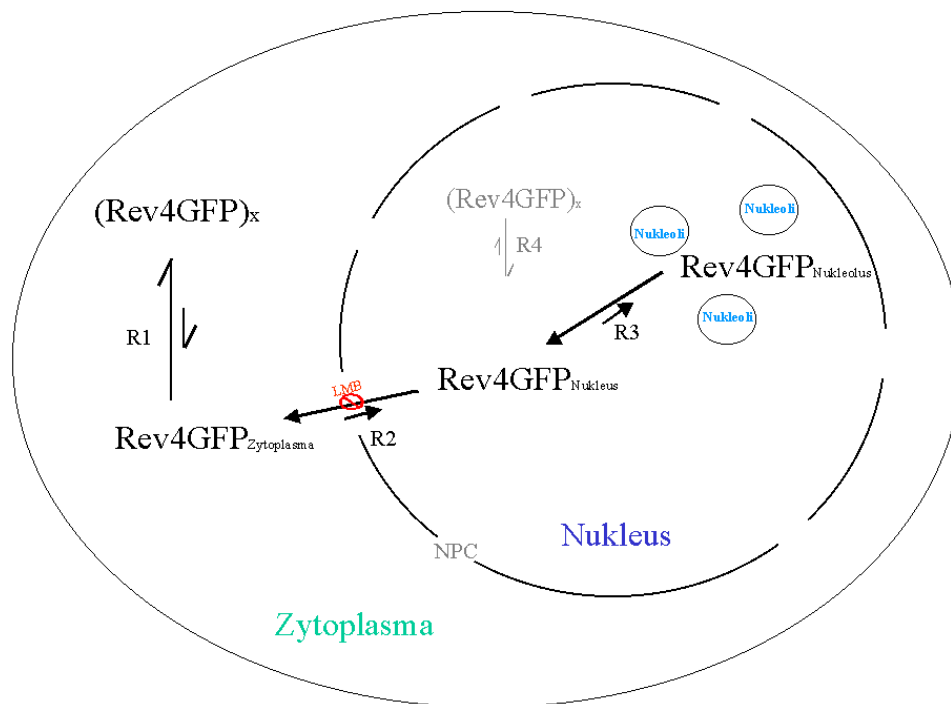


Abbildung 5.6.1: Schematische Darstellung der möglichen Reaktionsabläufe (R), die zu der zellulären Lokalisation des Rev4GFP-Fusionsproteins führen können. Unabhängige Reaktionsverläufe sind durch entgegenläufige normale Pfeile (\rightarrow), im Gleichgewicht stehende, zusammenhängende Reaktionsverläufe sind durch chemische Gleichgewichtspfeile symbolisiert. Eine Verschiebung einer Reaktion in eine bestimmte Richtung ist durch die unterschiedliche Länge der Pfeile gekennzeichnet. R1 findet hierbei im Zytoplasma statt, R2 durch die Kernporen, R3 und möglicherweise auch R4 laufen im Nukleus ab. R3 steht für eine Lokalisationsverschiebung zwischen Nukleoplasma und Nukleoli. Die durch den Einsatz von LMB blockierte Reaktion ist rot gekennzeichnet. x steht für eine unbekannte Anzahl von Proteinen, die in einem Komplex verbunden sind.

Die Reaktionsschritte R1 und R4 sind in diesem Schema als reine Protein:Protein-Interaktionen (darum chemische Gleichgewichtspfeile) betrachtet. Hierbei binden Proteine nicht-kovalent durch Wasserstoffbrückenbindungen, apolare hydrophobe Bindungen von Kohlenwasserstoffseitenketten (Val, Leu, Ile, Phe) oder Ionenbindungen zwischen basischen und sauren Aminosäureseitenketten (Lys, Arg, His, Asp, Glu). Diese Bindungen unterliegen daher einem chemischen Gleichgewicht, einer somit andauernden Assoziation und Dissoziation. Da sich bei gleichbleibenden Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeiten nicht ändern, werden diese Reaktionen in ihrem Ablauf hauptsächlich durch die Menge der vorhandenen Reaktionspartner und die Stärke der Bindung bestimmt. Eine stärkere Bindung würde die Reaktion der Dissoziation mindern. Der Schritt R2 fasst die Transportwege des Kernimports und -exports zusammen. Hierbei interagieren jeweils mehrere Proteine (Kap. 1.3 und 1.4), was aktiv zu der Einstellung eines Gradienten zwischen dem Zytoplasma und dem

Nukleoplasma führt. Die Weiterleitung bzw. die Sequestrierung der transportierten Rev4GFP-Proteine hin zu einem zytoplasmatischen Komplex führt hierbei jedoch ebenfalls zu Verschiebung des eingestellten Zustandes, dadurch dass einer der Transportwege eingeschränkt wird. Dies ist auch der Fall wenn z.B. einer Rev-Mutante eines der Signalpeptide fehlt.

Im Normfall liegt Rev oder RevGFP in den Nukleoli des Zellkerns von Hela-Zellen vor. Diese Verteilung kann durch speziell diskutierte NOS-Sequenzen („Nucleolar Localization Signal“) (Cochrane, Perkins, and Rosen, 1990), aber auch durch die Bindung von Rev an spezielle nukleoläre Proteine wie B23 (Fankhauser et al., 1991; Schatz et al., 1998; Szebeni et al., 1997) oder rRNA (D'Agostino et al., 1995; Michienzi et al., 2000) hervorgerufen werden. Ebenso wurde gezeigt, dass neben der nukleolären Lokalisation von Rev dort auch verschiedene Nukleoporene und Crm1 gefunden werden können. Die Theorie wurde aufgestellt, dass die Bildung des Rev-Crm1-Nukleopore-Komplexes, der später zum Export von Rev führt, bereits in den Nukleoli abläuft (Zolotukhin and Felber, 1999). Da Rev in diesem Fall vermehrt in den Nukleoli des Zellkerns durch verschiedene Bindungen zurückgehalten wird, verschiebt sich in der in Abbildung 5.6.1 gezeigten Kette die Gleichgewichtsreaktion R3 zugunsten der Nukleoli. RevGFP kann zwar theoretisch ebenfalls komplexe Aggregate ausbilden, die aber nicht zu einer Retention im Zytoplasma (R4 im Gleichgewicht) führen. Freies RevGFP wird dann ständig in den Kern importiert und kann dort in den Nukleoli akkumulieren. Durch eine Blockade des Crm1-vermittelten Exportes kann eine Reaktionsrichtung von R2 nicht mehr ablaufen und deshalb lässt sich Rev4GFP, genauso wie RevGFP, wieder verstärkt im Nukleus und den Nukleoli nachweisen.

Risp lokalisiert wie beschrieben hauptsächlich im Zytoplasma (Kap. 4.10). Diese Verschiebung der Lokalisation ist nur gering, im Vergleich zur gleichmäßigen Verteilung von GFP. Die Lokalisation von Risp könnte sich dadurch erklären, dass es weder durch eine starke Bindung auf einer Seite der Kernmembran gehalten wird noch über starke Lokalisationssignale verfügt, die extrem einer Gleichverteilung entgegenwirken würden. Abbildung 5.6.2 veranschaulicht die möglichen beteiligten Vorgänge. Dies muss im Zusammenhang mit dem KIAA0592-Gesamtproteins gesehen werden. KIAA0592 hat durch die anhand der Peptidversuche gezeigte Sequenz (Kap. 4.10.4) theoretisch die Möglichkeit in der Kern transportiert zu werden. Dies scheint anhand der Lokalisationsstudien nur zu einem geringen Anteil oder nur unter bestimmten noch nicht näher charakterisierten Umständen abzulaufen. Das bedeutet, für Risp gibt es bisher nur einen untersuchten Reaktionsablauf, den Kernexport und import (Abb. 5.6.2, R2), der die Lokalisation beeinflusst. Zwei weitere Reaktionen

sind auf Grund der Ergebnisse, dass Risp in der Lage ist an sich selbst zu binden denkbar, aber noch nicht gezeigt (R1, R3).

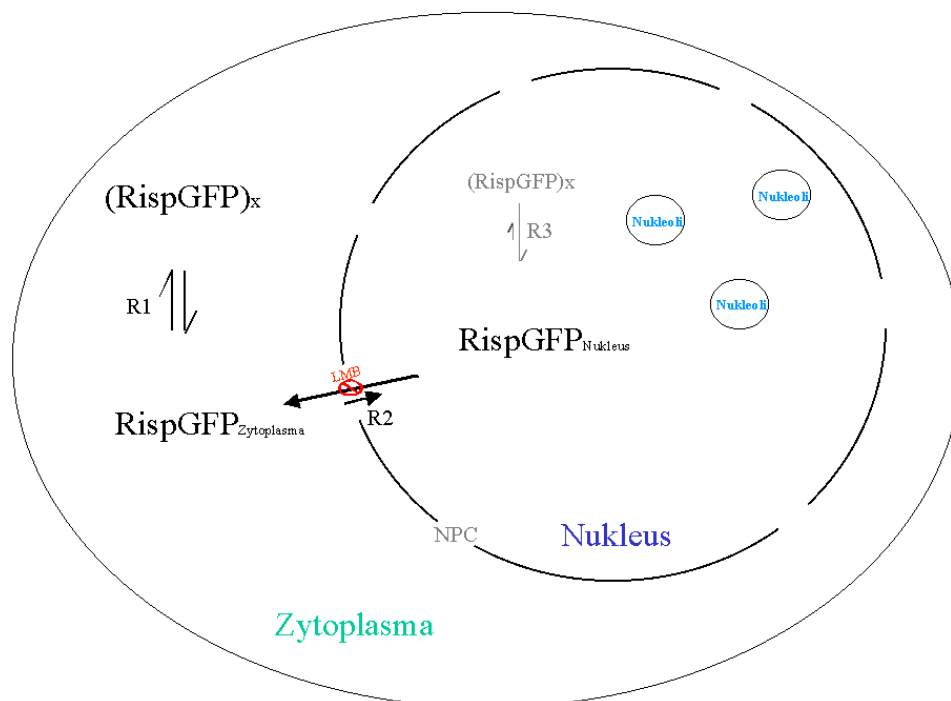


Abbildung 5.6.2: Schematische Darstellung der möglichen Reaktionsabläufe (R), die zu der zellulären Lokalisation des RispGFP-Fusionsproteins führen können. Unabhängige Reaktionsverläufe sind durch entgegengesetzte Pfeile (\rightleftharpoons), im Gleichgewicht stehende, zusammenhängende Reaktionsverläufe sind durch chemische Gleichgewichtspfeile symbolisiert. Eine Verschiebung einer Reaktion in eine bestimmte Richtung ist durch die unterschiedliche Länge der Pfeile gekennzeichnet. R1 findet hierbei im Zytoplasma statt, R2 durch die Kernporen und möglicherweise läuft R3 im Nukleus ab. Die durch den Einsatz von LMB blockierte Reaktion ist rot gekennzeichnet. x steht für eine unbekannte Anzahl von Proteinen, die in einem Komplex verbunden sind.

Für Risp konnte die Fähigkeit zur Bindung an sich selbst (also zumindest zur Dimerisierung) gezeigt werden. Die durch Expressionsplasmide kodierte Proteine RispGFP, Risp4GFP oder KIAA0592 neigten zu keiner vermehrten Aggregation und Komplexbildung (Kap. 4.4.3 und 4.10.). Das bedeutet, dass R1 und R3 hier keinen Einfluss auf die Lokalisation haben. Darum kann davon ausgegangen werden, dass diese beobachtete Lokalisation von Risp bzw. KIAA0592 durch einen gerichteten Transport durch die Kernporen (Reaktionen R2), der durch die erkannten NES- und NLS-Sequenzen vermittelt wird, hervorgerufen wird.

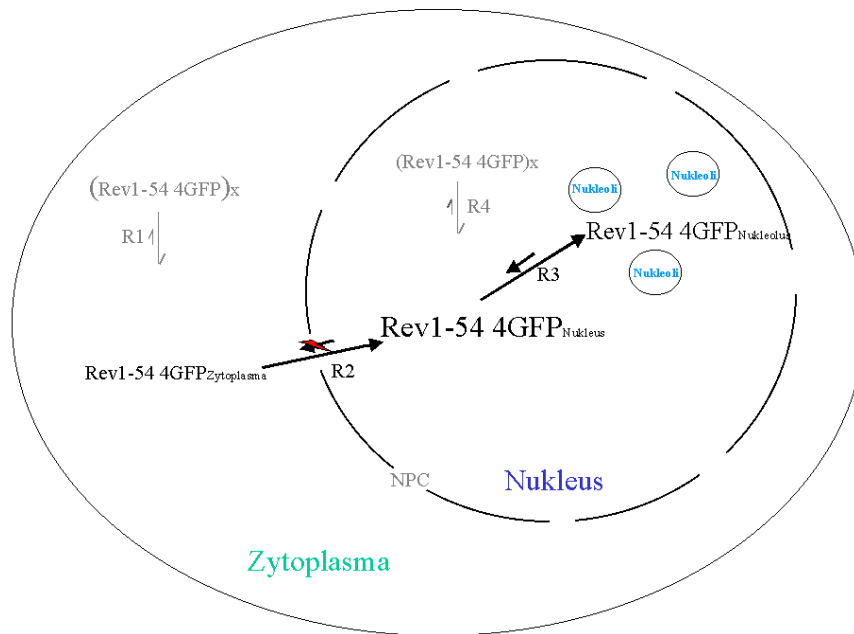
Welchen Effekt hat nun ein Risp-Anteil auf eine C-terminal verkürzte Form von Rev (= Rev1-54). Die Abbildung 5.6.3 zeigt die möglichen Translokationsschritte, welche

einen Einfluss auf die Lokalisation von Rev1-54 4GFP oder Rev 1-54Risp 4GFP haben könnten. Betrachtet man die Lokalisationen im speziellen Fall der 4GFP-Fusionskonstrukte, lässt sich ein Einfluss der Risp-Sequenz ermitteln und erklären. Rev1-54 4GFP (Abb. 5.6.3A) verfügt nicht mehr über die zweite Multimerisierungsdomäne und das NES von Rev. Der Reaktionsweg R2 läuft demnach in beide Richtungen ab und so verschiebt sich die Proteinlokalisierung in den Kern, in dem dann wiederum die Verteilung in die Nukleoli abläuft (R3). Rev1-54 4GFP existiert somit nach der Translation nur kurz und nicht im Übermaß im Zytoplasma und besitzt auch nicht die für das vollständige Rev beschriebenen Multimerisierungseigenschaften. Somit sollten die Reaktionen R1 im Zytoplasma und auch R4 im Kern kaum einen Einfluss haben. Im Fall von Rev1-54Risp 4GFP (Abb. 5.6.3B) bewirken die in dieser Arbeit gezeigten Fähigkeiten von Risp (Dimerisierung und Kernexport) eine veränderte Lokalisation des Fusionsproteins. Der Reaktionsablauf R2 kann in diesem Fall wieder in beide Richtungen ablaufen und somit ist Rev1-54Risp 4GFP zu ca. 50 % auch im Zytoplasma lokalisiert.

Dies zeigt wiederum, dass Risp eine funktionale Kernexporteigenschaft besitzt und diese auch eine Auswirkung auf Rev haben kann. Diese Beeinflussung wirkt sich allerdings nur im Zusammenhang mit einer ohnehin veränderten Rev-Lokalisation durch vier fusionierte GFP-Reste aus.

Die ursprüngliche Frage ob durch die Aminosäuresequenz von Risp fusioniert an den N-terminalen Teil von Rev ein Protein entsteht, das die Fähigkeit des Exports viraler mRNA aus dem Kern beibehält, lässt sich deutlich verneinen. Im Kapitel 4.10.3 konnte gezeigt werden, dass Rev1-54Risp weder mit einem noch vier GFP-Domänen fusioniert funktional ist. Dies bedeutet, dass sich trotz der Kopplung einer Crm1-Interaktionsdomäne an Rev und der zumindest theoretisch gezeigten Fähigkeit des Fusionsproteins zu dimerisieren keine Rev-Funktionalität herstellen lässt. Demzufolge sind an dem Rev-vermittelten mRNA-Export weitere in diesem experimentellen Ansatz nicht rekonstituierte Rev-Domänen beteiligt. Der Einfluss von Crm1 auf die Funktion von Rev ist demnach als essentiell, aber nicht ausreichend zu bewerten (im Gegensatz zu (Yi, Bogerd, and Cullen, 2002)).

A.



B.

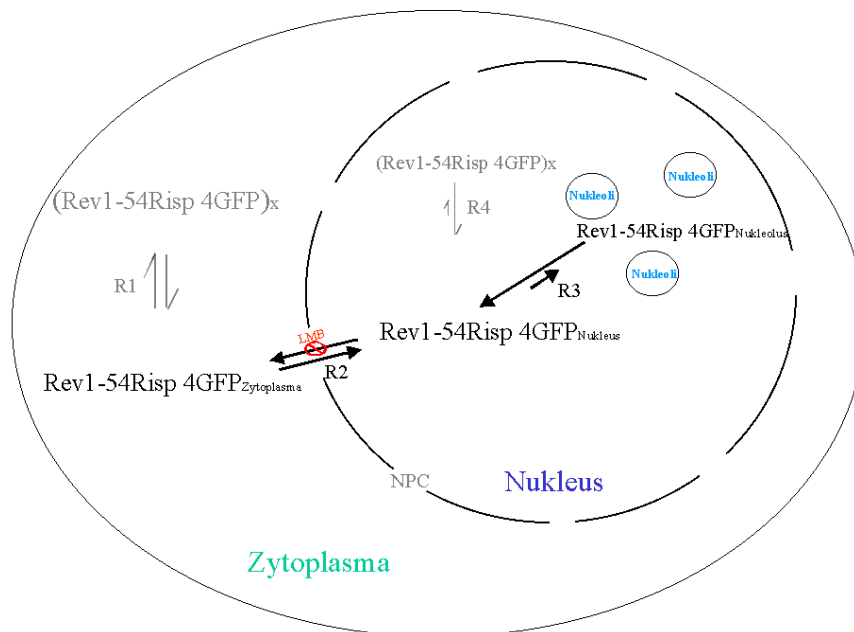


Abbildung 5.6.3: Schematische Darstellung der möglichen Reaktionsabläufe (R), die zu der zellulären Lokalisation der Rev1-54 4GFP- (A) und Rev1-54Risp 4GFP- (B) Fusionsproteine führen können. Unabhängige Reaktionsverläufe sind durch entgegenläufige normale Pfeile (\rightarrow), im Gleichgewicht stehende, zusammenhängende Reaktionsverläufe sind durch chemische Gleichgewichtspfeile symbolisiert. Eine Verschiebung einer Reaktion in eine bestimmte Richtung ist durch die unterschiedliche Länge der Pfeile gekennzeichnet. R1 findet hierbei im Zytoplasma statt, R2 durch die Kernporen, R3 und möglicherweise auch R4 laufen im Nukleus ab. Die rote Markierung in A zeigt, dass dem Rev1-54 4GFP-Protein kein Signal zum Kernexport mehr zur Verfügung steht. Die durch den Einsatz von LMB blockierte Reaktion in B ist rot gekennzeichnet. x steht für eine unbekannte Anzahl von Proteinen, die in einem Komplex verbunden sind.

Ermittelte Eigenschaften	KIAA0592	Risp
Chromosom	10q11.22	s. KIAA0592
Kopien des Gens	1	s. KIAA0592
Exons	30	3
mRNA: Größe und Vorkommen	4,6 kbp (AB011164) versch. Zelllinien und versch. Geweben (Nagase et al., 1998a)	671 bp versch. Zelllinien und versch. Geweben (Nagase et al., 1998a)
Proteingröße	1372 AS, errechnet 148 kD detektiert ca. 200 kD	171 AS, 19 kD
theoretisch mögliche Proteinmodifikationen (PROSITE)	78	11 (Ceccherini-Silberstein, 2001)
Transmembran-domäne	ja	nein
„Coiled Coil“-Domänen	ja	nein
homologe mRNA (human)	AK001686, XM_051956, AK001545	AK001686, XM_051956,
homologe Proteine (human)	T00347, BAA91036, T12501	s. KIAA0592
homologe Proteine in anderen Spezies	AAK53434 (<i>C. griseus</i>) NP_080861 (<i>M. musculus</i>) XP_23289 (<i>R. norvegicus</i>)	s. KIAA0592
Lokalisationssignale	s. Risp	NES, NLS (Ceccherini-Silberstein, 2001)
beobachtete intrazelluläre Lokalisation	fast ausschließlich zytoplasmatisch	63 % zytoplasmatisch (RispGFP)
Crm1-abhängiger Kernexport	k.A.	ja
Bindungseigenschaften	k.A.	Rev, Crm1, Risp (Y2H, M2H)
Promotor	950 bp stromaufwärts des Gens sind schwach aktiv	k.A.

Tabelle. 5.6.1: Zusammenfassung der nach dieser Arbeit bekannten Eigenschaften von KIAA0592 und Risp. Alle Informationen wurden in dieser Arbeit ermittelt. Zusätzliche Erkenntnisse, die bereits bekannt waren, sind durch eine Referenz belegt. (k.A. = keine Angaben möglich, da noch nicht untersucht).

Tabelle 5.6.1 zeigt eine Zusammenfassung der über KIAA0592 und Risp bekannten (s. Zitate) und in dieser Arbeit ermittelten neuen Erkenntnisse.

Verschiedene Proteine wurden mit KIAA0592-ähnlichen Eigenschaften beschrieben. Darunter sind Proteine, die strukturelle Komponenten beherbergen, NES-Fähigkeiten besitzen, aber auch beispielsweise am mRNA-Export beteiligt sind wie Mrnp 41 („mRNA binding protein of 41 kDa“)(Kraemer and Blobel, 1997), transkriptionell aktiv sind wie LPP („LIM-containing lipoma-preferred partner“(Petit et al., 2000)), oder Genexpression regulieren wie Lamin (Hutchison, 2002).

Ein Zusammenhang zwischen KIAA0592/Risp, Rev und Crm1 könnte in der Art zustande kommen, dass KIAA0592 in direkter Weise mit dem Kernexport verschiedener Substrate durch Crm1 verknüpft ist und vielleicht den Export direkt mit verschiedenen Zellstrukturen des Zytoskeletts verbindet oder sogar selbst zu diesen Strukturen beiträgt. Möglicherweise liegt diese Verbindung beiderseits der Kernporen vor, was zu einem Netzwerk von Strukturelementen außerhalb und innerhalb der Kernpore führen könnte.

5.7 Ausblicke

Zwei Merkmale sollten im Verlauf der weiteren Forschung an KIAA0592/Risp vorrangig untersucht werden: Zum einen der Einfluss des gesamten KIAA0592komplett oder des kurzen durch Risp repräsentierten Abschnittes auf die Eigenschaften und Funktionen von Rev, aber auch der gesamten HIV-Replikation. Hierzu werden Rev-Funktionstests oder Untersuchungen der Partikelproduktion von infizierten Zellen nötig, welche unter dem Einfluss einer Überexpression von KIAA0592komplett oder Risp durchgeführt werden. Hierbei sollte auch berücksichtigt werden, dass KIAA0592 in unterschiedlichen Zellen in verschiedenen Mengen endogen vorliegt. Möglicherweise führt eine Überexpression in diesen Zellen zu einem unterschiedlichen Einfluss auf die Rev-Funktion. Im Besonderen ist der Einfluss von KIAA0592komplett/Risp auf die verminderte Funktion von Rev in verschiedenen Astrozyten von Interesse. Wichtig in diesem Zusammenhang ist sicherlich die Konstruktion eines experimentellen Systems, in dem die endogene Expression von KIAA0592komplett verhindert werden kann. Hierzu ist die Verwendung von spezifischen RNAi- oder siRNA-Stücken, die Expression von antisense RNA durch Expressionsplasmide von KIAA0592, aber auch die Herstellung einer KIAA0592 „knock out“-Zelllinie denkbar.

Die Unterdrückung der endogenen Expression ist auch ein wichtiger Ansatzpunkt zur Ermittlung der eigentlichen zellulären Funktion von KIAA0592. Die Erkenntnisse der *in silico* Analysen der KIAA0592komplett-Proteinsequenz und der genomischen DNA-Sequenzen inklusive der regulatorischen Sequenzen könnte ebenfalls als Ansatzpunkt für Experimente dienen, die zur Entschlüsselung der Funktion von KIAA0592 führen. Dabei sollten die spezifischen Proteinmodifikationen experimentell untersucht werden. Vielversprechend ist das Fortschreiten der Sequenzierung der Genomsequenzen der Maus, der Ratte und des Hamsters, aber auch anderer Spezies. Falls vollständige genomische Sequenzen zur Verfügung stehen, könnte durch einen Vergleich der regulatorischen Bereiche der homologen Gene vielleicht ein gemeinsamer Promotor ermittelt werden. Danach kann anhand der TF-Bindungsstellen nach ebenso regulierten Genen gesucht werden. Dies könnte das KIAA0592-Gen wiederum in Zusammenhang mit einer bestimmten Funktion bringen.

Essentiell für weitere Untersuchungen ist letztlich die Entschlüsselung der zellulären Funktion des KIAA0592-Proteins. Von speziellem Interesse im Bereich der Virologie sind die Auswirkungen auf Rev und HIV im Allgemeinen.

Zusammenfassung

Risp wurde in einer früheren Arbeit in einem Hefesystem als ein neues; mit HIV-1 Rev interagierendes zelluläres Protein beschrieben, das dem C-terminalen Teil eines weitaus größeren Proteins (KIAA0592) zu entsprechen schien. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Organisation des KIAA0592-Gens zu untersuchen und die biochemischen und strukturellen Eigenschaften des KIAA0592-Proteins zu ermitteln.

Es gelang erstmals das vollständige, KIAA0592komplett-Protein in verschiedenen Zelllinien zu exprimieren und einem Promotorbereich zuzuordnen. Somit konnten die *in silico*-Daten über das Vorhandensein dieses Gens inklusive regulatorischer Bereiche experimentell verifiziert werden. Es konnte anhand der verfügbaren Datenbanken gezeigt werden, dass zu KIAA0592 homologe Proteine und genomische Bereiche in den verschiedensten Spezies (*H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* und *C. griseus*) konserviert sind. Dies weist auf essentielle zelluläre Funktionen hin. Um mögliche Funktionen des bisher nicht charakterisierten KIAA0592-Proteins zu analysieren, wurden anhand der Aminosäuresequenz spezifische strukturelle und funktionale Eigenschaften vorausgesagt. KIAA0592 enthält Transmembranbereiche, superhelikale „Coiled Coil“-Strukturen und Bereiche für unterschiedlichste posttranslationale Modifikationen. Es konnte durch *in silico*-Sequenzanalysen und *in vitro*-Expressionsanalysen gezeigt werden, dass das als Rev-interagierend identifizierte Protein Risp ein Teil des KIAA0592-Proteins darstellt. Bei der ursprünglich identifizierten cDNA handelte es sich demnach um einen unvollständigen Sequenzbereich von KIAA0592. Das erstmals *in trans* exprimierte gesamte KIAA0592komplett-Protein zeigte eine starke zytoplasmatische Lokalisation, wie auch die Risp-Domäne alleine. Es wurde in einem Säugerzellsystem gezeigt, dass Risp Interaktionen mit Rev und Crm1 eingeht und in der Lage ist, zumindest zu dimerisieren. Für Rev ist bekannt, dass es ebenfalls mit dem Kernexportrezeptor Crm1 interagiert, und dass diese Eigenschaften essentiell für die Aktivierungsfunktion von Rev ist. Deswegen wurden die Lokalisations- bzw. Transporteigenschaften der Rev-interagierenden Proteindomäne (= Risp) von KIAA0592 und der Einfluss auf die Aktivierungsfunktion von Rev untersucht. In den verwendeten eukaryotischen Zelllinien lokalisiert Risp hauptsächlich im Zytoplasma, es ist aufgrund der identifizierten Import- und Exportsignale jedoch zum nukleozytoplasmatischen Transport fähig. Diese Transportfähigkeit von Risp ließ sich auf eine C-terminal deletierte Rev-Variante (Rev1-54) übertragen. Trotzdem konnte durch diese Substitution die Funktionalität von Rev nicht wiederhergestellt werden. Eine Crm1-Rekrutierung an Rev ist offensichtlich nicht alleine ausreichend, ein funktionales RRE-mRNA exportierendes Rev-Protein zu konstruieren. Es handelt sich bei KIAA0592/Risp um ein Protein, das nicht nur HIV-1 Rev bindet, sondern ebenso über strukturelle Komponenten verfügt und durch Crm1 mit dem Kernexport verbunden ist.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	<i>Name:</i>	<u>Christian</u> , Ernst Bickel
	<i>geboren am:</i>	09. August 1972 in Treuchtlingen, Bayern
	<i>Familienstand:</i>	ledig
	<i>Eltern:</i>	<u>Ernst</u> , Friedrich Bickel Diplomverwaltungswirt, Dienststellenleiter der VGem. Altmühltal <u>Christel</u> , Helene Bickel, geb.: Müller Hausfrau
	<i>Geschwister:</i>	<u>Andreas</u> , Hermann Bickel Diplomverwaltungswirt, WWA-Nürnberg
Schulausbildung:	<i>09/1978 - 07/1982</i>	Grundschule Markt Berolzheim-Dittenheim
	<i>09/1982 - 07/1991</i>	Simon-Marius-Gymnasium, Gunzenhausen
	<i>Schulabschluss:</i>	Allgemeine Hochschulreife, mit der Gesamtnote <i>gut</i> (2,0).
Wehrersatzdienst:	<i>08/1991- 10/1992</i>	Kreiskrankenhaus Weißenburg (Apotheke).
Studium:	<i>10/1992 - 03/1999</i>	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians- Universität, Würzburg.
	<i>Abschluss:</i>	Diplom der Biologie mit der Gesamtnote <i>sehr gut</i> .
	<i>08/1995 - 07/1996</i>	Austauschprogramm der Universität Würzburg mit der State University of New York in Albany, N.Y. als „non-degree graduate student“.
	<i>Auslandsstipendien:</i>	Universität Würzburg, DAAD
Dissertationsarbeit	<i>11/1999 - 4/2002</i>	Promotionsstudium an der Ludwig- Maximilians-Universität, München.
	<i>10/1999 - 12/2002</i>	Institut für Molekulare Virologie, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Oberschleißheim.

Danksagung

Hiermit möchte ich mit bei allen bedanken, die zu dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben. Im Besonderen danke ich folgenden Personen:

- meiner Betreuerin PD Dr. Ruth Brack-Werner für Ihre andauernde und ausdauernde Unterstützung, für fruchtbare Diskussionen und für das Vertrauen, das sie mir ständig entgegengebracht hat.
- Professor Brian Salmons für die Freundlichkeit meine Arbeit zu begutachten und sich mit meinen Ergebnissen auseinanderzusetzen.
- Professor Dr. Volker Erfle, der mir die Möglichkeit gegeben hat, im Institut für Molekulare Virologie (IMV) der GSF diese Arbeit durchzuführen.
- Dr. Francesca Ceccherini-Silberstein, die mich auf Ihre einzigartige Weise im IMV willkommen geheißen hat und mir die Grundlagen der Arbeit dort vermittelt hat.
- Dr. Markus Neumann, der mich ermutigt hat, mich dem ProQuaLo und dem Mac, zwei für mich fremden Wesen zu nähern und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.
- PD Dr. Thomas Werner, mit dessen Hilfe ich in die bioinformatische Welt eingetreten bin und für die vielen Diskussionen und die Hilfe bei der Promotorsuche.
- Debby Kubisiak, die erheblich zur Durchführung der Promotorexperimente beigetragen hat.
- Speziell allen meinen Kollegen in der IMV, durch welche die Zeit nie zu lang wurde, die Arbeit nie zu wenig und der Rat nie zu teuer war, und der Spaß nie zu kurz kam.
- Besonders danke ich Dr. Susanne Kramer-Hämmerle, die sich meiner am Ende annahm und die Fertigstellung dieser Arbeit durch Rat, Diskussion, den nötigen Druck und Freundschaft möglich gemacht hat.
- allen meinen Freunden und meiner Familie, die immer sehr geduldig mit mir waren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, der Unterzeichnende, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

München, Juni 2003

Christian Bickel

Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., and Yanagida, M. (1989). Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crml1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* **108**(4), 1195-207.
- Adam, S. A. (2001). The nuclear pore complex. *Genome Biol* **2**(9), REVIEWS0007.
- Adam, S. A., and Gerace, L. (1991). Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* **66**(5), 837-47.
- Amendola, A., Rodolfo, C., Di Caro, A., Ciccocanti, F., Falasca, L., and Piacentini, M. (2001). "Tissue" transglutaminase expression in HIV-infected cells: an enzyme with an antiviral effect? *Ann N Y Acad Sci* **946**, 108-20.
- Anderson, D. H. (1983). "Compartmental modeling and tracer kinetics." Springer, New York.
- Antes, T. J., Namciu, S. J., Fournier, R. E., and Levy-Wilson, B. (2001). The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry* **40**(23), 6731-42.
- Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C., 2nd, Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C., and Henderson, L. E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**(5090), 1935-8.
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* **273**(50), 33414-22.
- Bagasra, O., Khalili, K., Seshamma, T., Taylor, J. P., and Pomerantz, R. J. (1992). TAR-independent replication of human immunodeficiency virus type 1 in glial cells. *J Virol* **66**(12), 7522-8.
- Bai, J., Banda, N., Lee, N. S., Rossi, J., and Akkina, R. (2002). RNA-Based Anti-HIV-1 Gene Therapeutic Constructs in SCID-hu Mouse Model. *Mol Ther* **6**(6), 770-82.
- Baker, T. J., Luedtke, N. W., Tor, Y., and Goodman, M. (2000). Synthesis and anti-HIV activity of guanidinoglycosides. *J Org Chem* **65**(26), 9054-8.
- Barre-Sinoussi, F., Cherman, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzious, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- Barthelmes, J. (2001). Diplomarbeit. Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Studienfakultät Biowissenschaften, München.
- Beinfeld, M. C. (2003). Biosynthesis and processing of pro CCK: recent progress and future challenges. *Life Sci* **72**(7), 747-57.
- Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H. J., and Freese, E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**(28), 18877-83.
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wohl, T., Himmelsbach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettwitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F., and Hauber, J. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **271**(5257), 1858-60.
- Bigner, D. D., Bigner, S. H., Ponten, J., Westermarck, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L. F., and Wikstrand, C. J. (1981). Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **40**(3), 201-29.
- Bilodeau, P. S., Domsic, J. K., Mayeda, A., Krainer, A. R., and Stoltzfus, C. M. (2001). RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element. *J Virol* **75**(18), 8487-97.
- Bilodeau, P. S., Domsic, J. K., and Stoltzfus, C. M. (1999). Splicing regulatory elements within tat exon 2 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are characteristic of group M but not group O HIV-1 strains. *J Virol* **73**(12), 9764-72.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu Rev Biochem*.
- Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P. (2000a). Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem Suppl* **35**, 3-22.
- Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C. (2000b). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**(1), 73-90.
- Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., and Klehr-Wirth, D. (1995). Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* **162A**, 389-454.

- Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M., and Cullen, B. R. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J Virol* **72**(11), 8627-35.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**(3), 485-94.
- Bohnelein, E., Berger, J., and Hauber, J. (1991). Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J Virol* **65**(12), 7051-5.
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* **56**(3), 379-90.
- Borson, N. D., Salo, W. L., and Drewes, L. R. (1992). A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Appl* **2**(2), 144-8.
- Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* **162A**, 279-388.
- Brack-Werner, R., Kleinschmidt, A., Ludvigsen, A., Mellert, W., Neumann, M., Herrmann, R., Khim, M. C., Burny, A., Muller-Lantzsch, N., Stavrou, D., and et al. (1992). Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines. *Aids* **6**(3), 273-85.
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**(3 Pt 1), 1030-7.
- Brice, P. C., Kelley, A. C., and Butler, P. J. (1999). Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization. *Nucleic Acids Res* **27**(10), 2080-5.
- Buddecke, E. (1989). "Grundriss der Biochemie: Für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften." 8., neubearbeitete Auflage ed. Berlin; New York; de Gruyter.
- Campbell, L. H., Borg, K. T., Haines, J. K., Moon, R. T., Schoenberg, D. R., and Arrigo, S. J. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Rev is required in vivo for binding of poly(A)-binding protein to Rev-dependent RNAs. *J Virol* **68**(9), 5433-8.
- Canki, M., Thai, J. N., Chao, W., Ghorpade, A., Potash, M. J., and Volsky, D. J. (2001). Highly productive infection with pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) indicates no intracellular restrictions to HIV-1 replication in primary human astrocytes. *J Virol* **75**(17), 7925-33.
- Ceccherini-Silberstein, F. (2001). Dissertation. Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Chan, D. C., and Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- Chapman, R. L., Stanley, T. B., Hazen, R., and Garvey, E. P. (2002). Small molecule modulators of HIV Rev/Rev response element interaction identified by random screening. *Antiviral Res* **54**(3), 149-62.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. & Siebert, P. (1998). Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In "In RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis." (P. L. Eds. Siebert, J. Ed.), pp. 305-319. BioTechniques Books, MA.
- Chi, N. C., Adam, E. J., Visser, G. D., and Adam, S. A. (1996). RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J Cell Biol* **135**(3), 559-69.
- Chiodi, F., Fuerstenberg, S., Gidlund, M., Asjo, B., and Fenyo, E. M. (1987). Infection of brain-derived cells with the human immunodeficiency virus. *J Virol* **61**(4), 1244-7.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., and et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**(4761), 343-6.
- Coburn, G. A., and Cullen, B. R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* **76**(18), 9225-31.
- Cochrane, A., Perkins, A., and Rosen, C. (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of Human Immunodeficiency Virus Rev: Relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* **64**, 881-885.
- Costa, R. H., and Grayson, D. R. (1991). Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic Acids Res* **19**(15), 4139-45.
- Craig, J. M., and Bickmore, W. A. (1993). Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays* **15**(5), 349-54.
- Craig, J. M., and Bickmore, W. A. (1994). The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet* **7**(3), 376-82.
- Cremer, C., Munkel, C., Granzow, M., Jauch, A., Dietzel, S., Eils, R., Guan, X. Y., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Langowski, J., and Cremer, T. (1996). Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat Res* **366**(2), 97-116.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* **2**(4), 292-301.

- Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R. H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D., and Cremer, C. (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**(2), 179-212.
- Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietzel, S., Rinke, B., Schrock, E., Speicher, M. R., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P., and et al. (1993). Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**, 777-92.
- Crick, F. H. C. (1953). *Acta Crystallogica* **6**, 685-697.
- Daelemans, D., Afonina, E., Nilsson, J., Werner, G., Kjems, J., De Clercq, E., Pavlakis, G. N., and Vandamme, A. M. (2002). A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22), 14440-5.
- D'Agostino, D., Felber, B. K., Harrison, J. E., and Pavlakis, G. N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Molecular and Cellular Biol* **12**(3), 1375-1386.
- D'Agostino, D. M., Ciminale, V., Pavlakis, G. N., and Chieco-Bianchi, L. (1995). Intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: involvement of continued rRNA synthesis in nuclear retention. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(9), 1063-71.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**(2), 725-37.
- Demart, S., Ceccherine-Silberstein, F., Schlicht, S., Walcher, S., Wolff, H., Neumann, M., Erfle, V. Brack-Werner, R. (2003). The human immunodeficiency virus Rev protein has multiple nuclear targeting functions. *submitted*.
- Dewhurst, S., Bresser, J., Stevenson, M., Sakai, K., Evinger-Hodges, M. J., and Volsky, D. J. (1987 b). Susceptibility of human glial cells to infection with human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS* **213**(1), 138-143.
- Dewhurst, S., Sakai, K., Bresser, J., Stevenson, M., Evinger-Hodges, M. J., and Volsky, D. J. (1987 a). Persistent productive infection of human glial cells by human immunodeficiency virus (HIV) and by infectious molecular clones of HIV. *J Virol* **61**(12), 3774-82.
- Ding, S. F., Lombardi, R., Nazari, R., and Joshi, S. (2002). A combination anti-HIV-1 gene therapy approach using a single transcription unit that expresses antisense, decoy, and sense RNAs, and trans-dominant negative mutant Gag and Env proteins. *Front Biosci* **7**, a15-28.
- Dingwall, C., and Palacios, I. (1998). In vitro systems for the reconstitution of snRNP and protein nuclear import. *Methods Cell Biol* **53**, 517-43.
- Dundr, M., and Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* **356**(Pt 2), 297-310.
- Duzgunes, N., Simoes, S., Slepishkin, V., Pretzer, E., Rossi, J. J., De Clercq, E., Antao, V. P., Collins, M. L., and de Lima, M. C. (2001). Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH-sensitive liposomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **20**(4-7), 515-23.
- Emerman, M., Vazeux, R., and Peden, K. (1989). The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* **57**(7), 1155-65.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K., and Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* **30**(1), 235-8.
- Falvo, J. V., Ugialoro, A. M., Brinkman, B. M., Merika, M., Parekh, B. S., Tsai, E. Y., King, H. C., Morielli, A. D., Peralta, E. G., Maniatis, T., Thanos, D., and Goldfeld, A. E. (2000). Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Mol Cell Biol* **20**(6), 2239-47.
- Fang, J., Kubota, S., and Pomerantz, R. J. (2002). A trans-dominant negative HIV type 1 Rev with intact domains of NLS/NOS and NES. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(10), 705-9.
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P., and Laemmli, U. K. (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* **11**(5), 2567-75.
- Farazi, T. A., Waksman, G., and Gordon, J. I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **276**(43), 39501-4.
- Farjot, G., Sergeant, A., and Mikaelian, I. (1999). A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* **274**(24), 17309-17.
- Felber, B. K., Drysdale, C. M., and Pavlakis, G. N. (1990). Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol* **64**(8), 3734-41.
- Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G. N. (1989). Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci* **86**(5), 1495-9.
- Fernandez, L. A., Winkler, M., and Grosschedl, R. (2001). Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol Cell Biol* **21**(1), 196-208.

- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230), 245-6.
- Fineberg, K., Fineberg, T., Graessmann, A., Luedtke, N. W., Tor, Y., Lixin, R., Jans, D. A., and Loyer, A. (2003). Inhibition of nuclear import mediated by the Rev-arginine rich motif by RNA molecules. *Biochemistry* **42**(9), 2625-33.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., and Luhmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**(3), 475-83.
- Floer, M., and Blobel, G. (1999). Putative reaction intermediates in Crm1-mediated nuclear protein export. *J Biol Chem* **274**(23), 16279-86.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997a). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**(6), 1051-60.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997b). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]. *Cell* **90**(6), 1051-60.
- Fouts, D. E., True, H. L., Cengel, K. A., and Celander, D. W. (1997). Site-specific phosphorylation of the human immunodeficiency virus type-1 Rev protein accelerates formation of an efficient RNA-binding conformation. *Biochemistry* **36**(43), 13256-62.
- Frankel, A. D., and Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Ann Rev Biochem* **67**, 1-25.
- Frech, K., Danescu-Mayer, J., and Werner, T. (1997). A novel method to develop highly specific models for regulatory units detects a new LTR in GenBank which contains a functional promoter. *J Mol Biol* **270**(5), 674-87.
- Frech, K., Herrmann, G., and Werner, T. (1993). Computer-assisted prediction, classification, and delimitation of protein binding sites in nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **21**(7), 1655-64.
- Frisch, M., Frech, K., Klingenhoff, A., Cartharius, K., Liebich, I., and Werner, T. (2002). In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. *Genome Res* **12**(2), 349-54.
- Fritz, C. C., and Green, M. R. (1996). HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr Biol* **6**(7), 848-54.
- Fritz, C. C., Zapp, M., and Green, M. R. (1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV-1 Rev. *Nature* **376**, 848-854.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**(6657), 308-11.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., and Gelmann, E. P. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Cell* **220**, 865.
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J., and Hall, M. N. (1991). Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta* **1071**(1), 83-101.
- Geourjon, C., and Deleage, G. (1994). SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng* **7**(2), 157-64.
- Geourjon, C., and Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* **11**(6), 681-4.
- Goetze, S., Gluch, A., Benham, C., and Bode, J. (2003). Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains. *Biochemistry* **42**(1), 154-66.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I., Finley, R. L., Kolonin, M. G., Gyuris, J., and Brent, R. (1999). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. In "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley J. & Sons, Ed.), Vol. 4, pp. Unit 20.1.
- Görlich, D. (1997). Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* **9**(3), 412-9.
- Görlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm [In Process Citation]. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- Görlich, D., and Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**(5255), 1513-8.
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., and Laskey, R. A. (1995). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**(6546), 246-8.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virology* **36**, 59-74.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**(4), 791-803.
- Hach, A., Hon, T., and Zhang, L. (2000). The coiled coil dimerization element of the yeast transcriptional activator Hap1, a Gal4 family member, is dispensable for DNA binding but differentially affects transcriptional activation. *J Biol Chem* **275**(1), 248-54.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A., and Pavlakis, G. N. (1989). The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J Virol* **63**(3), 1265-74.

- Hamasaki, K., and Ueno, A. (2001). Aminoglycoside antibiotics, neamine and its derivatives as potent inhibitors for the RNA-protein interactions derived from HIV-1 activators. *Bioorg Med Chem Lett* **11**(4), 591-4.
- Harrington, R. D., and Geballe, A. P. (1993). Cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 entry into a CD4-expressing human cell line. *J Virol* **67**(10), 5939-47.
- Hatanaka, M. (1990). Discovery of the nucleolar targeting signal. *Bioessays* **12**(3), 143-8.
- Heguy, A. (1997). Inhibition of the HIV Rev transactivator: a new target for therapeutic intervention. *Frontiers in Bioscience* **2**, 283-293.
- Henderson, B. R., and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* **274**(5), 693-707.
- Hofmann, K., Stoffel, W. (1993). "Biologisches Chemie." 347 Hoppe-Seyler.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J., and Dabauvalle, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* **152**(5), 895-910.
- Hope, T. J., Klein, N. P., Elder, M. E., and Parslow, T. G. (1992). Trans-dominant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev occurs through formation of inactive protein complexes. *J Virol* **66**(4), 1849-55.
- Hope, T. J., McDonald, D., Huang, X. J., Low, J., and Parslow, T. G. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J Virol* **64**(11), 5360-6.
- Hutchison, C. J. (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(11), 848-58.
- Huttner, W. B. (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol* **50**, 363-76.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. (1995). In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *Embo J* **14**(15), 3617-26.
- Iovine, M. K., and Wentz, S. R. (1997). A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J Cell Biol* **137**(4), 797-811.
- Jain, C., and Belasco, J. G. (2001). Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Mol Cell* **7**(3), 603-14.
- Jenkins, Z. A., Haag, P. G., and Johansson, H. E. (2001). Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* **71**(1), 101-9.
- Jensen, K. K., Martini, L., and Schwartz, T. W. (2001). Enhanced fluorescence resonance energy transfer between spectral variants of green fluorescent protein through zinc-site engineering. *Biochemistry* **40**(4), 938-45.
- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Langhoff, E., and Haukenes, G. (1994). Subcellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J Virol* **68**(3), 1475-85.
- Khyse-Anderson (1984). Elektrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Kikuno, R., Nagase, T., Waki, M., and Ohara, O. (2002). HUGE: a database for human large proteins identified in the Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res* **30**(1), 166-8.
- Kjems, J., Brown, M., Chang, D. D., and Sharp, P. A. (1991). Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci* **88**(3), 683-7.
- Knudsen, S. (1999). Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics* **15**(5), 356-61.
- Koepp, D. M., Wong, D. H., Corbett, A. H., and Silver, P. A. (1996). Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors. *J Cell Biol* **133**(6), 1163-76.
- Kornblihtt, A. R., Pesce, C. G., Alonso, C. R., Cramer, P., Srebrow, A., Werbajh, S., and Muro, A. F. (1996). The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *Faseb J* **10**(2), 248-57.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **12**(2), 857-72.
- Kraemer, D., and Blobel, G. (1997). mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17), 9119-24.
- Krasinski, S. D., Van Wering, H. M., Tannemaat, M. R., and Grand, R. J. (2001). Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(1), G69-84.

- Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T., Endo, S., Maki, M., and Hatanaka, M. (1989). Functional similarity of HIV-1 Rev and HTLV-I Rex proteins: Identification of a new nucleolar-targeting signal in Rev Protein. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 963-970.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**(2), 540-7.
- Kumagai, I., Takahashi, T., Hamasaki, K., Ueno, A., and Mihara, H. (2000). Construction of HIV Rev peptides containing peptide nucleic acid that bind HIV RRE IIB RNA. *Bioorg Med Chem Lett* **10**(4), 377-9.
- Kumagai, I., Takahashi, T., Hamasaki, K., Ueno, A., and Mihara, H. (2001). HIV Rev peptides conjugated with peptide nucleic acids and their efficient binding to RRE RNA. *Bioorg Med Chem Lett* **11**(9), 1169-72.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor [see comments]. *Cell* **90**(6), 1061-71.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Laemmli, U. K., Kas, E., Poljak, L., and Adachi, Y. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* **2**(2), 275-85.
- Landschutz, W. H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988). *Science* **240**, 1759-1764.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**(5), 500-5.
- Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G. N., and Klausner, R. D. (1999). Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* **19**(2), 1486-97.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B. O., and He, J. J. (2002a). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol* **76**(16), 8374-82.
- Li, J., Liu, Y., Park, I. W., and He, J. J. (2002b). Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J Virol* **76**(9), 4526-35.
- Li, J., Tang, H., Mullen, T. M., Westberg, C., Reddy, T. R., Rose, D. W., and Wong-Staal, F. (1999). A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1. *Proc Natl Acad Sci* **96**(2), 709-14.
- Liebich, I., Bode, J., Reuter, I., and Wingender, E. (2002). Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res* **30**(15), 3433-42.
- Li-En Jao, D., and Yu Chen, K. (2002). Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *J Cell Biochem* **86**(3), 590-600.
- Ludwig, E., Ceccherini-Silberstein, F., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M., and Brack-Werner, R. (1999). Diminished Rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes. *J Virol* **73**(10), 8279-89.
- Luo, Y., Yu, H., and Peterlin, B. M. (1994). Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* **68**(6), 3850-6.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**(10), 375-82.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**(19), 2476-89.
- MacKay, D. B. a. S., T. A. (1981). *Nature* **290**, 744-749.
- Madore, S. J., Tiley, L. S., Malim, M. H., and Cullen, B. R. (1994). Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. *Virology* **202**(1), 186-94.
- Makalowski, W. (2001). The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol* **48**(3), 587-98.
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1989). Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**(1), 205-14.
- Malim, M. H., and Cullen, B. R. (1991). HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**(2), 241-8.
- Malim, M. H., Hauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B. R. (1988). Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**(6186), 181-3.
- Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans- activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**(4), 675-83.
- Marques, S. M., Veyrune, J. L., Shukla, R. R., and Kumar, A. (2003). Restriction of human immunodeficiency virus type 1 Rev function in murine A9 cells involves the Rev C-terminal domain. *J Virol* **77**(5), 3084-90.
- Maruyama, K., and Sugano, S. (1994). Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**(1-2), 171-4.
- Mautino, M. R. (2002). Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther* **2**(1), 23-43.

- Mautino, M. R., and Morgan, R. A. (2002a). Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA. *Hum Gene Ther* **13**(9), 1027-37.
- Mautino, M. R., and Morgan, R. A. (2002b). Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes. *AIDS Patient Care STDS* **16**(1), 11-26.
- Mautino, M. R., and Morgan, R. A. (2002c). Inhibition of HIV-1 replication by novel lentiviral vectors expressing transdominant Rev and HIV-1 env antisense. *Gene Ther* **9**(7), 421-31.
- McLaughlin, S., and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **20**(7), 272-6.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., and Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor [published erratum appears in J Cell Biol 1994 Jan;124(1-2):217]. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 2), 1649-59.
- Mermer, B., Felber, B. K., Campbell, M., and Pavlakis, G. N. (1990). Identification of trans-dominant HIV-1 Rev protein mutants by direct transfer of bacterially produced proteins into human cells. *Nucleic Acids Res* **18**(8), 2037-44.
- Michienzi, A., Cagnon, L., Bahner, I., and Rossi, J. J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16), 8955-60.
- Mietus-Snyder, M., Glass, C. K., and Pitas, R. E. (1998). Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBPbeta: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(9), 1440-9.
- Mirkovitch, J., Gasser, S. M., and Laemmli, U. K. (1987). Relation of chromosome structure and gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **317**(1187), 563-74.
- Miyazaki, Y., Nosaka, T., and Hatanaka, M. (1996). The post-transcriptional regulator Rev of HIV: Implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Biochimie* **78**, 1081-1086.
- Miyazaki, Y., Takamatsu, T., Nosaka, T., Fujita, S., Martin, T. E., and Hatanaka, M. (1995). The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Exp Cell Res* **219**(1), 93-101.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). "Molekulare Virologie." 2.Auglage ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin.
- Morgan, R. A. (1999). Genetic strategies to inhibit HIV. *Mol Med Today* **5**(10), 454-8.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G., and Radu, A. (1995). Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci* **92**(14), 6532-6.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1998a). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* **5**(1), 31-9.
- Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1998b). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* **5**(6), 355-64.
- Najera, I., Krieg, M., and Karn, J. (1999). Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J Mol Biol* **285**(5), 1951-64.
- Nehrbass, U., and Blobel, G. (1996). Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science* **272**(5258), 120-2.
- Neumann, M. (1993). Dissertation rer. nat. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Neumann, M., Afonina, E., Ceccherini-Silberstein, F., Schlicht, S., Erfle, V., Pavlakis, G. N., and Brack-Werner, R. (2001). Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein. *J Cell Sci* **114**(Pt 9), 1717-29.
- Neumann, M., Felber, B. K., Kleinschmidt, A., Froese, B., Erfle, V., Pavlakis, G. N., and Brack-Werner, R. (1995). Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function. *J Virol* **69**(4), 2159-67.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I., and Rosbash, M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**(10), 767-75.
- Nickerson, J. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* **114**(Pt 3), 463-74.
- Nickerson, J. A., Blencowe, B. J., and Penman, S. (1995). The architectural organization of nuclear metabolism. *Int Rev Cytol* **162A**, 67-123.
- Niehhs, C., Beisswanger, R., and Huttner, W. B. (1994). Protein tyrosine sulfation, 1993--an update. *Chem Biol Interact* **92**(1-3), 257-71.

- Nusrat, A., Chen, J. A., Foley, C. S., Liang, T. W., Tom, J., Cromwell, M., Quan, C., and Mrsny, R. J. (2000). The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* **275**(38), 29816-22.
- Ohara, O., Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., and Nomura, N. (1997). Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res* **4**(1), 53-9.
- Ohno, M., Fornerod, M., and Mattaj, I. W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**(3), 327-36.
- Ohtsuki, K., Maekawa, T., Harada, S., Karino, A., Morikawa, Y., and Ito, M. (1998). Biochemical characterization of HIV-1 Rev as a potent activator of casein kinase II in vitro. *FEBS Lett* **428**(3), 235-40.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M., and Rosen, C. A. (1990). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev* **4**(8), 1357-64.
- Palmeri, D., and Malim, M. H. (1999). Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* **19**(2), 1218-25.
- Paulin, L. a. C. R. B. (1953). *Nature* **171**, 59-61.
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* **38 Suppl 5**, S3-10.
- Pederson, T. (2000). Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell* **11**(3), 799-805.
- Pelech, S. L., and Charest, D. L. (1995). MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* **1**, 33-52.
- Peri, S., and Pandey, A. (2001). A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends Genet* **17**(12), 685-7.
- Perkins, A., Cochrane, A. W., Ruben, S. M., and Rosen, C. A. (1989). Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus Rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**(3), 256-63.
- Perry, S. V. (2001). Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* **22**(1), 5-49.
- Petit, M. M., Fradelizi, J., Golsteyn, R. M., Ayoubi, T. A., Menichi, B., Louvard, D., Van de Ven, W. J., and Friederich, E. (2000). LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol Biol Cell* **11**(1), 117-29.
- Phillips, G. N., Jr. (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol* **7**(6), 821-7.
- Pikaard, C. S. (1998). Chromosome topology-organizing genes by loops and bounds. *Plant Cell* **10**(8), 1229-32.
- Pollard, V. W., and Malim, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Ann Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Pomerantz, R. J., Seshamma, T., and Trono, D. (1992). Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol* **66**, 1809-1813.
- Pongoski, J., Asai, K., and Cochrane, A. (2002). Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral RNA splicing. *J Virol* **76**(10), 5108-20.
- Powell, D. M., Amaral, M. C., Wu, J. Y., Maniatis, T., and Greene, W. C. (1997). HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3), 973-8.
- Radany, E. H., Brenner, M., Besnard, F., Bigornia, V., Bishop, J. M., and Deschepper, C. F. (1992). Directed establishment of rat brain cell lines with the phenotypic characteristics of type 1 astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14), 6467-71.
- Reddy, T. R., Suhasini, M., Xu, W., Yeh, L. Y., Yang, J. P., Wu, J., Artzt, K., and Wong-Staal, F. (2002). A role for KH domain proteins (Sam68-like mammalian proteins and quaking proteins) in the post-transcriptional regulation of HIV replication. *J Biol Chem* **277**(8), 5778-84.
- Reddy, T. R., Xu, W., Mau, J. K., Goodwin, C. D., Suhasini, M., Tang, H., Frimpong, K., Rose, D. W., and Wong-Staal, F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev [published erratum appears in Nat Med 1999 Jul;5(7):849]. *Nat Med* **5**(6), 635-42.
- Redinbaugh, M. G., and Turley, R. B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* **153**(2), 267-71.
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**(1), 1-16.
- Rexach, M., and Blobel, G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**(5), 683-92.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* **20**(6), 1320-30.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* **21**(11), 2664-71.

- Richard, N., Iacampo, S., and Cochrane, A. (1994). HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm. *Virology* **204**(1), 123-31.
- Rochlitz, J. (2000). Diplomarbeit. Technische Universität München
Studienfakultät für Biologische Wissenschaften.
- Rosorius, O., Reichart, B., Kratzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M. C., and Hauber, J. (1999). Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* **112** (Pt 14), 2369-80.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D., and et al. (1993). Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans- activation. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1), 1309-20.
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B. M., and Zink, D. (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* **146**(6), 1211-26.
- Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T: (1989). Molecular cloning-A Laboratory manual. *Cold Spring Harbour-Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-7.
- Schatz, O., Oft, M., Dascher, C., Schebesta, M., Rosorius, O., Jaksche, H., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998). Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4), 1607-12.
- Schon, U., Seifarth, W., Baust, C., Hohenadl, C., Erfle, V., and Leib-Mosch, C. (2001). Cell type-specific expression and promoter activity of human endogenous retroviral long terminal repeats. *Virology* **279**(1), 280-91.
- Schubeler, D., Mielke, C., Maass, K., and Bode, J. (1996). Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* **35**(34), 11160-9.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E. M., and Pavlakis, G. N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**(6), 2519-29.
- Sharp, P. A. (1988). RNA splicing and genes. *Jama* **260**(20), 3035-41.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* **16**(8), 869-71.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem* **150**(1), 76-85.
- Smit-McBride, Z., Dever, T. E., Hershey, J. W., and Merrick, W. C. (1989). Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein. *J Biol Chem* **264**(3), 1578-83.
- Sreedhara, A., and Cowan, J. A. (2001). Targeted site-specific cleavage of HIV-1 viral Rev responsive element by copper aminoglycosides. *J Biol Inorg Chem* **6**(2), 166-72.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**(6), 1041-50.
- Stauber, R., Gaitanaris, G. A., and G, P. (1995). Analysis of Trafficking of Rev and Transdominant Rev Proteins in Living Cells Using Green Fluorescent Protein Fusions: Transdominant Rev Blocks the Export of Rev from the Nukleus to the Cytoplasm. *Virology* **213**, 439-449.
- Stauber, R., Gaitanaris, G. A., and Pavlakis, G. N. (1995). Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology* **213**(2), 439-49.
- Stavrou, D., Bise, K., Groeneveld, J., Stocker, U., Kretschmar, H. A., Keiditsch, E., and Mehraein, P. (1989). Antigenic heterogeneity of human brain tumors defined by monoclonal antibodies. *Anticancer Res* **9**(6), 1489-96.
- Stavrou, D., Keiditsch, E., Schmidberger, F., Bise, K., Funke, I., Eisenmenger, W., Kurrle, R., Martin, B., and Stocker, U. (1987). Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern. *J Neurol Sci* **80**(2-3), 205-20.
- Steinkasserer, A., Jones, T., Sheer, D., Koettnitz, K., Hauber, J., and Bevec, D. (1995). The eukaryotic cofactor for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) rev protein, eIF-5A, maps to chromosome 17p12-p13: three eIF-5A pseudogenes map to 10q23.3, 17q25, and 19q13.2. *Genomics* **25**(3), 749-52.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., and Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**(3), 243-51.
- Stutz, F., Izaurralde, E., Mattaj, I. W., and Rosbash, M. (1996). A role for nucleoporin FG repeat domains in export of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and RNA from the nucleus. *Mol Cell Biol* **16**(12), 7144-50.

- Stutz, F., Neville, M., and Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* **82**(3), 495-506.
- Suzuki, Y., Yamashita, R., Nakai, K., and Sugano, S. (2002). DBTSS: DataBase of human Transcriptional Start Sites and full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res* **30**(1), 328-31.
- Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A., and Sugano, S. (1997). Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* **200**(1-2), 149-56.
- Swedlow, J. R., and Lamond, A. I. (2001). Nuclear dynamics: where genes are and how they got there. *Genome Biol* **2**(3), REVIEWS0002.
- Szebeni, A., Mehrotra, B., Baumann, A., Adam, S. A., Wingfield, P. T., and Olson, M. O. (1997). Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* **36**(13), 3941-9.
- Szebeni, A., and Olson, M. O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* **8**(4), 905-12.
- Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Boe, S. O., Haukenes, G., and Kalland, K. H. (1997). Oligomerization of HIV-1 Rev mutants in the cytoplasm and during nuclear import. *Virology* **235**(1), 73-81.
- Takahashi, Y., Ueno, A., and Mihara, H. (2001). Heterogeneous assembly of complementary peptide pairs into amyloid fibrils with alpha-beta structural transition. *ChemBiochem* **2**(1), 75-9.
- Talcott, B., and Moore, M. S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol* **9**(8), 312-8.
- Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcarcel, J., and Kjems, J. (2001). The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *Embo J* **20**(20), 5748-58.
- Tange, T. O., Jensen, T. H., and Kjems, J. (1996). In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem* **271**(17), 10066-72.
- Tange, T. O., and Kjems, J. (2001). SF2/ASF binds to a splicing enhancer in the third HIV-1 tat exon and stimulates U2AF binding independently of the RS domain. *J Mol Biol* **312**(4), 649-62.
- Tatusova, T. A., and Madden, T. L. (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* **174**(2), 247-50.
- Temin, H. M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
- Thomas, S. L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998). Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J Virol* **72**(4), 2935-44.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**(24), 4876-82.
- Tok, J. B., Dunn, L. J., and Des Jean, R. C. (2001). Binding of dimeric aminoglycosides to the HIV-1 rev responsive element (RRE) RNA construct. *Bioorg Med Chem Lett* **11**(9), 1127-31.
- Truant, R., and Cullen, B. R. (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**(2), 1210-7.
- Turner, B. G., and Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**(1), 1-32.
- Ullman, K. S., Powers, M. A., and Forbes, D. J. (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin [comment]. *Cell* **90**(6), 967-70.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22), 12142-9.
- Venkatesh, L. K., Mohammed, S., and Chinnadurai, G. (1990). Functional domains of the HIV-1 rev gene required for trans-regulation and subcellular localization. *Virology* **176**(1), 39-47.
- Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm Genome* **10**(2), 168-75.
- White, G. C., 2nd, Pickens, E. M., Liles, D. K., and Roberts, H. R. (1998). Mammalian recombinant coagulation proteins: structure and function. *Transfus Sci* **19**(2), 177-89.
- Wilson, I. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**, 365-394.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo- cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* **4**(2), 139-47.
- Wolff, H. (2003). Dissertation. Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wong, M. M., and Fish, E. N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* **15**(1), 5-14.
- Xiao, G., Kumar, A., Li, K., Rigl, C. T., Bajic, M., Davis, T. M., Boykin, D. W., and Wilson, W. D. (2001). Inhibition of the HIV-1 rev-RRE complex formation by unfused aromatic cations. *Bioorg Med Chem* **9**(5), 1097-113.

- Yi, R., Bogerd, H. P., and Cullen, B. R. (2002). Recruitment of the Crm1 nuclear export factor is sufficient to induce cytoplasmic expression of incompletely spliced human immunodeficiency virus mRNAs. *J Virol* **76**(5), 2036-42.
- Yi, R., Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., and Cullen, B. R. (2002). Both ran and importins have the ability to function as nuclear mRNA export factors. *Rna* **8**(2), 180-7.
- Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G., and Green, M. R. (1991). Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine- rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci* **88**(17), 7734-8.
- Zirbel, R. M., Mathieu, U. R., Kurz, A., Cremer, T., and Lichter, P. (1993). Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res* **1**(2), 93-106.
- Zolotukhin, A. S., and Felber, B. K. (1999). Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* **73**(1), 120-7.